



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**MOLEKULOVĚ IMPRINTOVANÉ POLYMERY JAKO  
NÁSTROJ PRO IZOLACI KLÍČOVÝCH BIOLOGICKY  
AKTIVNÍCH MOLEKUL**

MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS AS A TOOL FOR THE ISOLATION OF KEY  
BIOLOGICALLY ACTIVE MOLECULES

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Milada Vodová

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

Ing. Lukáš Nejdí, Ph.D.

BRNO 2019

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1414/2018  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Milada Vodová**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Lukáš Nejd, Ph.D.**  
Akademický rok: 2018/19

### Název bakalářské práce:

Molekulově imprintované polymery jako nástroj pro izolaci klíčových biologicky aktivních molekul

### Zadání bakalářské práce:

1. Základní rešerše o principu a využitelnosti molekulově imprintovaných polymerů
2. Příprava a optimalizace molekulově imprintovaných polymeru selektivních pro zvolenou nukleovou bázi
3. Ověření selektivity připraveného materiálu a izolace nukleové báze z reálného vzorku
4. Vyhodnocení vlastností připravených imprintovaných materiálů

### Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Milada Vodová  
student(ka)

-----  
Ing. Lukáš Nejd, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústav

V Brně dne 31.1.2019

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Bakalářská práce je zaměřena na přípravu a optimalizaci molekulově imprintovaných polymerů selektivních pro vybranou nukleovou bázi (uracil). Molekulově imprintované polymery, které sloužili pro selektivní izolaci uracilu, byly připraveny technikou nekovalentního imprintingu za využití dopaminu jako funkčního monomeru. Detekce izolovaného uracilu byla provedena pomocí kapilární elektroforézy s absorpční detekcí ( $\lambda$ –260 nm). Podrobně byly zkoumány podmínky přípravy molekulově imprintovaných polymerů, jejich vazebné vlastnosti, adsorpční kinetika a selektivita. Dále byly takto připravené polymerní materiály využity pro selektivní izolaci a detekci uracilu z komplexních vzorků. Jako komplexní vzorky byly použity rajčatové výrobky, kde uracil sloužil jako indikátor bakteriální kontaminace.

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis is focused on preparation and optimization of molecularly imprinted polymers that are selective for the selected nucleobase (uracil). Molecularly imprinted polymers, which were used for selective uracil isolation, have been prepared non-covalent imprinting technique. As a function monomer was used in this case dopamine. The detection of isolated uracil was made by capillary electrophoresis with absorption detection ( $\lambda$ –260 nm). Conditions for preparation of molecularly imprinted polymers, their binding properties, adsorption kinetics, and selectivity were investigated in detail. Mentioned polymer materials were as well used for uracil selective isolation and detection from complex samples. Tomato products were used as complex samples. Uracil in those samples was used as an indicator of bacterial contamination.

## **KLIČOVÁ SLOVA**

Molekulově imprintovaný polymer, nukleové báze, dopamin, uracil, kapilární elektroforéza

## **KEYWORDS**

Molecularly imprinted polymers, nucleic bases, dopamine, uracil, capillary electrophoresis

## PROHLAŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Lukáši Nejdlovi, Ph.D. za umožnění vypracovat tuto bakalářskou práci pod jeho vedením a za čas, který mi věnoval. Dále bych chtěla poděkovat za spolupráci Ing. Jaroslavě Bezděkové za její trpělivost, pomoc při přípravě měření, za spoustu skvělých nápadů a nejvíce za pomoc a rady ohledně bakalářské práce. Také bych ráda poděkovala doc. Mgr. Markétě Vaculovičové, Ph.D. za vřelé jednání a skvělé nápady. Děkuji i celému kolektivu z Výzkumné skupiny bionanoanalýzy a genového inženýrství na Mendelově univerzitě v Brně za příjemnou atmosféru během celkového měření na pracovišti. Také bych poděkovala své rodině za podporu při vypracování této práce.

## OBSAH

1	Úvod .....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Molekulově imprintované polymery (MIPs) .....	8
2.1.1	Historie MIPs.....	8
2.1.2	Možné varianty přípravy MIPs.....	8
2.1.3	Typy polymerizace MIPs.....	10
2.1.4	Funkční monomery.....	12
2.1.5	Funkční monomer dopamin.....	14
2.1.6	Templát.....	14
2.1.7	Nukleové báze .....	15
2.1.8	Uracil .....	16
2.2	Metody detekce .....	17
2.2.1	QCM .....	17
2.2.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	18
2.2.3	Kapilární elektrochromatografie.....	18
2.2.4	Kapilární elektroforéza .....	18
3	Cíle práce.....	21
4	Experimentální část.....	22
4.1	Materiály .....	22
4.2	Přístrojové vybavení .....	22
4.3	Popis experimentu.....	22
4.4	Metody .....	23
4.4.1	Příprava MIPs a NIPs .....	23
4.4.2	Metoda separace a detekce nukleových kyselin .....	23
4.4.3	Optimalizace promývacího roztoku.....	23
4.4.4	Optimalizace koncentrace dopaminu.....	23
4.4.5	Adsorpční vlastnosti MIPs a NIPs.....	23
4.4.6	Homogenizace potravin .....	24
5	Výsledky a diskuze.....	25
5.1	Optimalizace promytí.....	25
5.2	Optimalizace koncentrace funkčního monomeru (dopamin).....	26
5.3	Kinetika adsorpce.....	27

5.4	Ověřování vazebných vlastností .....	28
5.5	Ověření vazebné selektivity .....	29
5.6	Indikace bakteriální kontaminace v potravinách .....	30
5.6.1	Rajče soudkové.....	31
5.6.2	Rajčatová Polévka .....	33
5.6.3	Rajčatový protlak.....	34
5.6.4	Rajčatový protlak po inokulaci bakterií.....	35
6	Závěr.....	37
7	Seznam použitých zkratek a symbolů .....	38
8	Seznam použitých zdrojů .....	39

# 1 ÚVOD

Mikrobiální kontaminace potravin se řadí mezi nejzávažnější problémy současnosti. Nemoci způsobené jejich požitím jsou rozšířené ve všech částech světa, Českou republiku nevyjímaje. Například v roce 2016 byl v České republice zaznamenán vyšší výskyt bakterie rodu *Listeria* v některých potravinách (mražená kukuřice, masné pomazánky apod.) a vlivem toho i vyšší výskyt onemocnění listeriózou.

V současnosti bývá mikrobiální kontaminace potravin stanovována např. na základě koncentrace mikrobiálních metabolitů, mezi které patří kyselina mléčná nebo octová. Bohužel tyto látky nejsou termostabilní, proto mohou poskytovat zkreslené výsledky. Je tedy snaha nalézt nové, spolehlivější indikátory mikrobiální kontaminace. Jako vhodný indikátor je zkoumán např. uracil. Uracil se v potravinách přirozeně nevyskytuje, vzniká pouze jako vedlejší produkt metabolických drah mikroorganismů. Konkrétně se jedná o proces, během kterého je přirozeně se v potravinách vyskytující se uridin přeměněn na uracil a ribózu. Velkou výhodou tohoto metabolického produktu je termostabilita.

K detekci uracilu se nejčastěji používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Mezi nevýhody této metody však patří nutnost předpřípravy vzorku, používání rozpouštědel a vyšší spotřeba vzorku v porovnání s kapilární elektroforézou, pomocí které byl uracil detekován v předložené bakalářské práci. Náročná předpříprava vzorku byla v této práci elegantně vyřešena zapojením metody molekulového imprintingu.

Metoda molekulového imprintingu patří mezi relativně nové metody. Vyznačuje se vysokou selektivitou, chemickou stabilitou a mechanickou pevností. Princip spočívá v tvorbě specifických vazebných míst selektivních pro otiskovanou molekulu v polymerním materiálu. Výsledným produktem molekulového imprintingu jsou molekulově imprintované polymery. Velkou výhodou je i to, že je možné připravit si imprintovaný polymer pro téměř pro jakýkoli analyt od iontů až po velké struktury jako jsou např. buňky.

Vytvořená metoda tedy umožňuje izolovat indikátor mikrobiální kontaminace uracil použitím molekulově imprintovaných polymerů z komplexních vzorků (potravin) a následně jej detekovat za použití kapilární elektroforézy s UV-Vis detekcí. Tato metoda by mohla nalézt uplatnění v potravinářském průmyslu a pomoci zabezpečit produkci kvalitních a mikrobiálně nezávadných potravin.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Molekulově imprintované polymery (MIPs)

Molekulový imprinting je technika, při které dochází k tvorbě specifických vazebných míst komplementárních s otištěnou molekulou (templátem/analytem) v zesíťovaných polymerech. Výsledným produktem molekulového imprintingu jsou MIPs. MIPs mají řadu výhod, mezi něž patří například to, že vykazují vysokou chemickou stabilitu, mechanickou pevnost, umožňují vytvoření komplementárních vazebných míst pro různé typy molekul či větších struktur (částice, bakterie apod.), je možné je produkovat ve velkém měřítku a opakovaně je využívat. Díky těmto unikátním vlastnostem mají MIPs široké uplatnění v celé řadě biochemických aplikací [1].

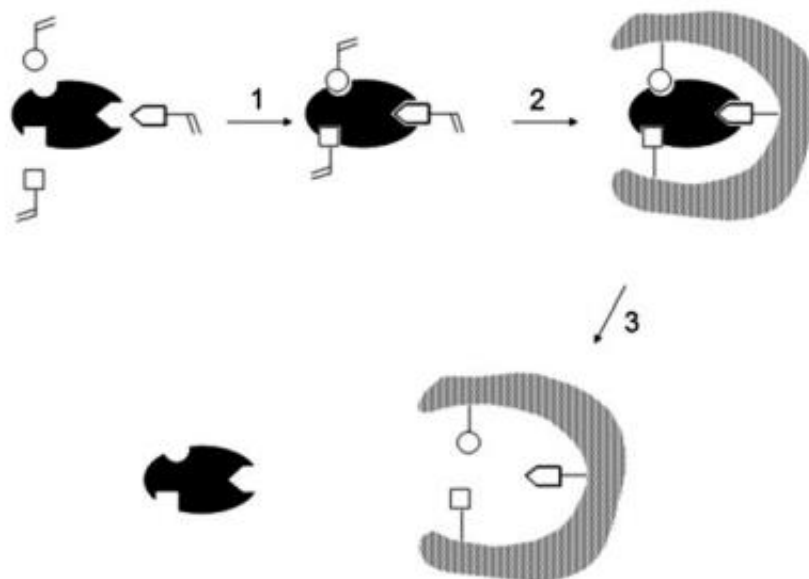
#### 2.1.1 Historie MIPs

Počátek molekulového imprintingu se datuje kolem roku 1931, kdy Polyakov poprvé syntetizoval MIPs z anorganického oxidu křemičitého. Polyakov vypořádal, že oxid křemičitý připravený v přítomnosti organického rozpouštědla, vykazuje vyšší selektivitu pro zvolené organické rozpouštědlo, a to dokonce i v přítomnosti jiných organických rozpouštědel [2]. V několika následujících letech vývoj křemičitého imprintování dále pokračoval. V roce 1949, Frank Dickey zveřejnil výsledky experimentů provedených s křemičitými gely připravenými v přítomnosti organických barviv [3]. Ačkoliv se křemičité imprintování dále rozvíjelo, počet publikací v této oblasti zůstal nízký. Důvodem pro omezené využívání imprintingu byla jejich nízká stabilita a malá reprodukovatelnost. Po dvaceti letech intenzivního výzkumu v této oblasti došlo k poklesu počtu studií zaměřených na molekulární imprintování oxidu křemičitého a současně se začaly objevovat první práce zabývající se molekulárně imprintovanými organickými polymery. O několik let později Wulff a jeho spolupracovníci poprvé popsali metodu kovalentního imprintingu [4]. Druhý zásadní průlom v oblasti molekulového imprintování organických polymerů nastal až v roce 1981, kdy Mosbach a Arshady připravili organické MIPs za použití nekovalentních interakcí. Díky této metodě mohl dále pokračovat výzkum molekulového imprintingu [2, 5] a v roce 1995 byl tak objeven nový přístup k dané problematice. Whitcombe a jeho spolupracovníci kombinovali výhody obou dvou doposud využívaných přístupů [6]. Přístup využíval kovalentní interakci během procesu polymerace a nekovalentní interakce v průběhu opětovného navázání otištěné molekuly [2, 6]. Během posledních 20 let se zvýšil zájem o tuto techniku, což se odráží na počtu publikací do roku 2014. V minulosti byl molekulový imprinting zaměřen na izolaci malých molekul. V současné době jsou středem zájmu makromolekuly a větší struktury jako jsou např. buňky a částice [2].

#### 2.1.2 Možné varianty přípravy MIPs

Příprava MIPs je založena na polymerizaci zvoleného funkčního monomeru v přítomnosti templátu (otiskované molekuly/analytu). K některým funkčním monomerům je nezbytné také přidat vhodné zesíťovací činidlo a iniciátor reakce [1]. Po ukončení polymerizačního procesu je templát vymyt z polymerní matrice působením vhodného rozpouštědla za vzniku kavit selektivních pro otištěnou molekulu. Schéma přípravy MIPs je přehledně znázorněno na obrázku 1.





Obrázek 1: Schématické znázornění procesu přípravy molekulově imprintovaného polymeru: (1) interakce templátu s funkčním monomerem, (2) polymerace, (3) odstranění templátu a vznik selektivní kavity [7]

V současné době existují tři různé varianty přípravy molekulově imprintovaných materiálů (kovalentní, nekovalentní a semikovalentní), které se liší v typu vazby mezi templátem (otiskovanou molekulou/analytem) a funkčním monomerem, znázorněné na obrázku 2 [7].

### 1. Kovalentní imprinting

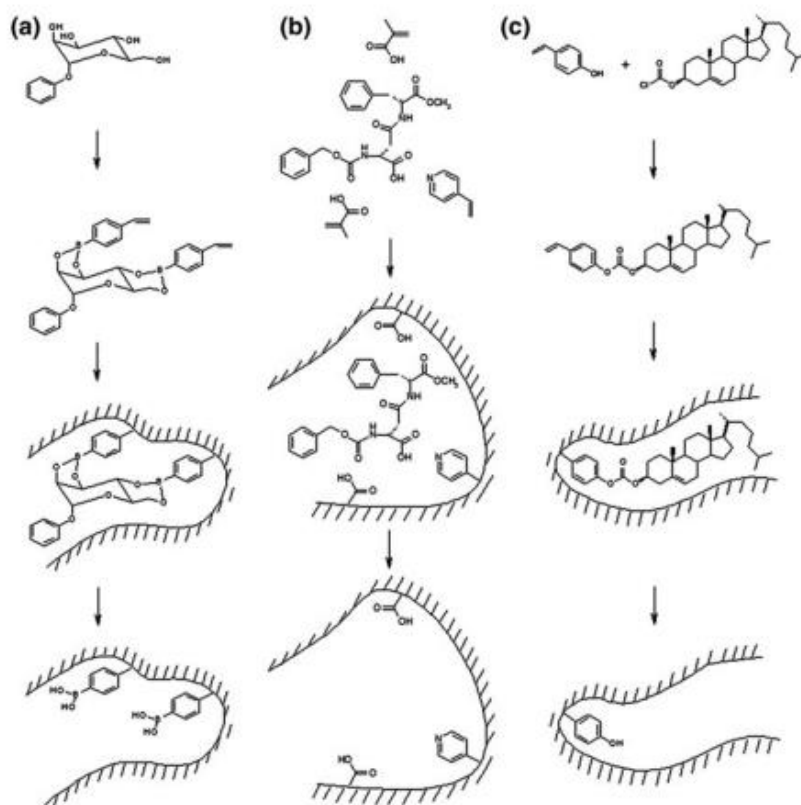
Pro tento přístup je typický vznik reverzibilní kovalentní vazby mezi templátem a funkčním monomerem. Po ukončení polymeračního kroku následuje vymytí templátu. Musí být zvoleny takové podmínky, při kterých dochází k rozštěpení kovalentní vazby a uvolnění templátu z polymerní vrstvy. Stejně jako templát se i analyt váže prostřednictvím kovalentních vazeb [4]. Výhodou tohoto přístupu je stabilita a vysoká selektivita připravovaných materiálů. Nevýhodou tohoto přístupu je pomalejší absorpční kinetika, a také náročnější příprava [8].

### 2. Nekovalentní imprinting

V tomto přístupu dochází mezi templátem a funkčním monomerem k nekovalentním vazebným interakcím (např. vodíkové vazby, iontové interakce, interakce  $\pi$ - $\pi$  vazeb, hydrofilní interakce či Van der Waalsovy síly) [9]. Při znovu navázání otiskované molekuly (analyt) dochází opět ke vzniku nekovalentních vazebných interakcí s vytvořeným polymerním materiálem. Nekovalentní imprinting je nejpoužívanější technikou pro přípravu MIPs [7]. Výhodou tohoto přístupu je jeho jednoduchost, velký výběr komerčně dostupných funkčních monomerů a rychlá vazebná kinetika [10]. Obrázek 2 znázorňuje schéma procesu nekovalentního impringu s využitím dipeptidového derivátu Cysteinu-kyseliny asparagové - methylyfenylalaninu jako templátu [10].

### 3. Semikovalentní imprinting

Tento přístup je unikátní v tom, že umožňuje kombinaci výhod kovalentního a nekovalentního imprintingu. Výsledný materiál vykazuje dobrou stabilitu, selektivitu i rychlou vazebnou kinetiku. Jeho příprava je však poněkud náročnější na syntetické dovednosti [6, 11]. V semikovalentním imprintingu se při tvorbě MIPs uplatňují kovalentní vazby a při znovu navazování otištěné molekuly vazby nekovalentní. [7].



Obrázek 2: Syntetické přístupy a) kovalentní, b) nekovalentní, c) semikovalentní molekulově imprintovaný přístup. Templáty použité v těchto přístupech jsou a) monosacharidy, b) dipeptid, c) cholesterol [7]

#### 2.1.3 Typy polymerizace MIPs

Existuje několik různých přístupů při polymerizaci MIPs. Volba vhodného přístupu se odvíjí od budoucí aplikace MIPs.

##### 1. Hromadná polymerizace v uzavřených prostorech

Tento typ polymerizace je uskutečňován v miniaturizovaných reaktorech, které definují tvar a parametry výsledné MIPs. Tímto způsobem lze připravit například kapilární kolony plněné MIPs, které mohou být použity k separaci různých typů vzorků např. pomocí kapilární (elektro)chromatografie [12]. Nevýhodou tohoto přístupu je, že probíhající reakce je vysoce exotermní a je obtížné ji kontrolovat. Další nevýhodou je i to, že vytvořená struktura pórů je obecně heterogenní a má široké rozložení velikostí. To vede mimo jiné i ke zpomalení kinetiky v důsledku vnitřní difúze molekul směrem k rozpoznávacím místům, která jsou vytvořena hluboko uvnitř

polymerní matrice. Kvůli této problematice byla navržena metoda povrchového molekulárního imprintingu [13]. U povrchového imprintingu jsou kavity umožňující selektivní rozpoznávání otištěné molekuly tvořeny v malé vrstvě přichycené na vhodně zvoleném nosiči a jsou situovány na povrchu, čímž dochází k eliminaci vnitřní difúze.

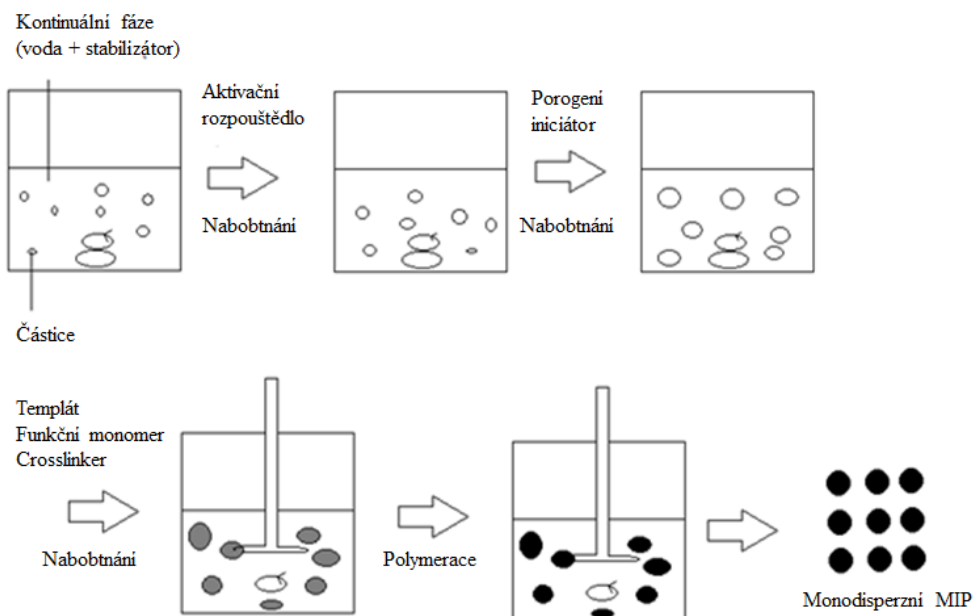
## 2. Příprava MIPs na definovaných strukturách

Při tomto typu polymerizace dochází k vytváření tenké vrstvy imprintovaného polymeru na předem definované struktury, jako jsou například sklíčka, destičky apod. Je však možné zvolit jako nosič imprintované vrstvy i částice s definovanou velikostí jako jsou například křemičité částice, kvantové tečky nebo magnetické částice. Pomocí této metody lze tedy vytvořit velmi homogenní skupinu MIPs [7].

## 3. Příprava nanočástic MIPs a mikrosfér

Pro tento způsob přípravy využívá klasická emulzní polymerizace. Tímto procesem je možné vytvářet částice rovnou z MIPs. Jako kontinuální fáze se používá směs vody a povrchově aktivní látky (detergent), které pomáhají udržovat stabilní dispergovanou fázi během polymerizace [7]. Takto připravené MIPs jsou polydisperzní [14]. Na obrázku 3 je znázorněna metoda přípravy takovýchto MIPs. Konkrétně se jedná o mikročástice MIPs s více stupňovým bobtnáním a následnou polymerací [14, 15].

V prvním kroku přípravy dochází k bobtnání částic v důsledku přítomnosti rozpouštědla. Ve druhém kroku dochází k opětovnému bobtnání díky přidavku pyrogenního iniciátoru. Následně je přidán templát, funkční monomer a zesíťovací činidlo. V průběhu míchání směsi dochází k dalšímu bobtnání a polymerizaci zavazníku monodisperzních MIPs.



Obrázek 3: Způsob přípravy sférických a monodisperzních MIPs pomocí více stupňovaného bobtnání a polymerace [14]

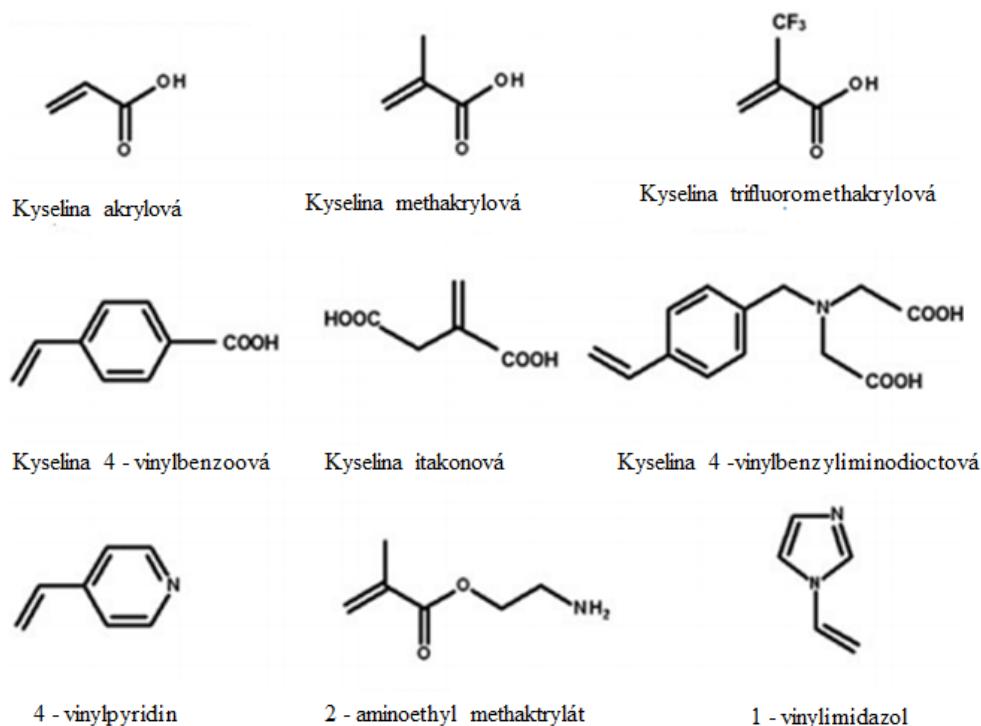
#### 2.1.4 Funkční monomery

V molekulovém imprintování hraje volba vhodného monomeru velmi důležitou roli. Aby došlo k tvorbě specifických vazebných míst, musí být funkční monomer schopen tvořit se zvoleným templátem dostatečně silné interakce. Většina funkčních monomerů má jen jednu dvojnou vazbu, a proto jsou schopny polymerizací vytvářet pouze lineární řetězce. K tvorbě MIPs je nezbytné do směsi přidat zesíťovací činidlo. Zesíťovací činidlo má dvě dvojně vazby a umožňuje tak propojení lineárních řetězců funkčního monomeru v trojrozměrnou síť. Aby proběhla polymerizace, musí být polymerizační reakce zahájena přídavkem iniciátoru. Iniciátory jsou látky, které se snadno rozpadají na volné radikály, reagují s funkčním monomermem a vyvolávají řetězovou reakci. Iniciátor může začít uvolňovat volné radikály např. působením teploty nebo UV záření [8].

Mechanismus polymerizace volných radikálů je charakterizován třemi stupni [16]:

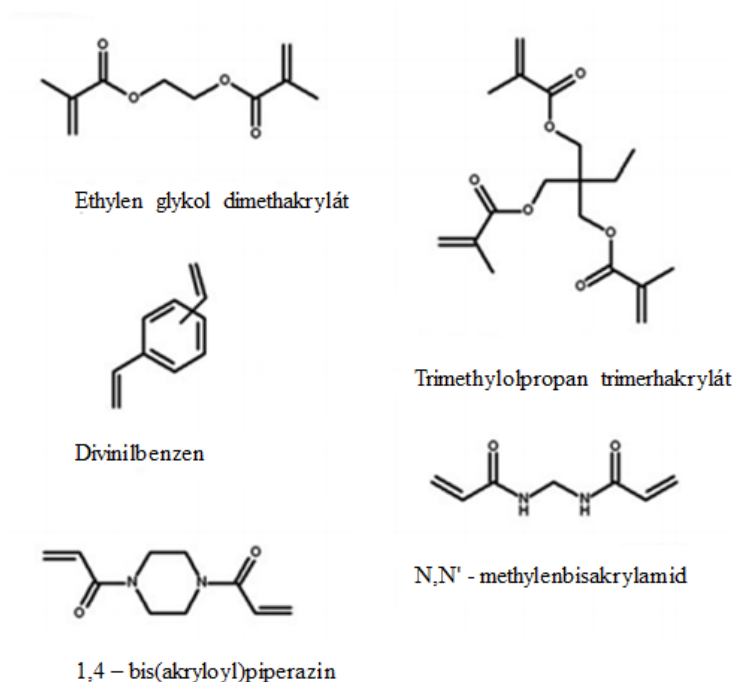
- **Iniciace** zahrnuje vytvoření aktivního centra s volnými radikály a většinou probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku dochází k tvorbě volných radikálů z rozkladu iniciátoru a ve druhém kroku k aktivaci funkčního monomeru v důsledku působení vzniklých volných radikálů [17].
- **Propagace** je proces, při kterém dochází k růstu polymerního řetězce [17].
- Při **terminaci** dochází k ukončení procesu propagace zablokováním aktivního centra. Pro ukončení radikálové polymerizace se používají nejčastěji dva mechanismy: kombinace a disproportionace. **Kombinace** zahrnuje spojování dvou růstových řetězců za vzniku jediné polymerní molekuly. **Disproportionace** zahrnuje přenos jednoho atomu vodíku z jednoho rostoucího řetězce polymeru na jiný. Tím se vytvoří různé koncové skupiny bez vzájemného propojení [17].

Struktury běžných funkčních monomerů jako jsou akrylamid, kyselina methakrylová, kyselina 2-(trifluormethyl)-akrylová a další, jsou znázorněny na obrázku 4. Nejpoužívanějším funkčním monomermem je kyselina methakrylová [18]. Tato molekula může působit jako donor nebo akceptor vodíkové vazby, nebo jako záporný iont karboxylové skupiny za vzniku stabilního komplexu s různými templáty. Methylenová skupina připojená k vinylovému uhlíku způsobuje, že vzniká vazba C-C [7]. Tato molekula tvoří pouze lineární řetězce, pro vytvoření polymerní sítě je nutné do polymerní směsi přidat zesíťovací činidlo.



Obrázek 4: Strukturní vzorce vybraných funkčních monomerů [7]

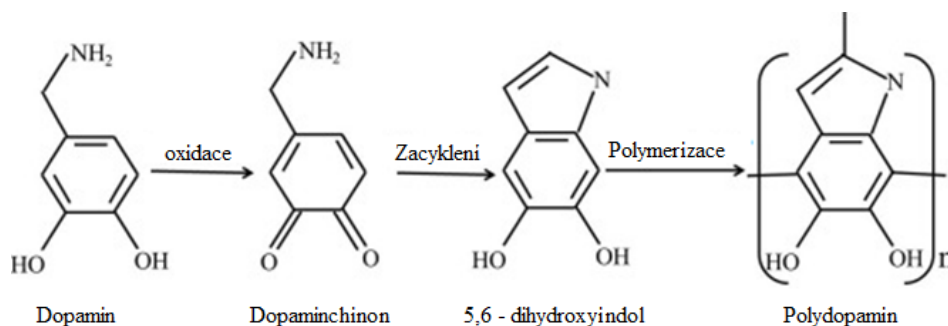
Na obrázku 5 jsou uvedena některá zesíťovací činidla, která se používají k přípravě MIP pro malé organické molekuly. Pro větší templáty jako jsou například proteiny, je často nutné použít více distančních jednotek, například poly-(ethylenglykol)-dimethakrylát [7]. Nízké hustoty zesíťování polymerního materiálu mohou vést k tvorbě měkké gelové MIP, která umožňuje dostatečně rychlou difúzi nezbytnou k navázání takových templátů, jako jsou proteiny [19].



Obrázek 5: Zesíťovací činidla využívaná v nekovalentním imprintingu [7]

### 2.1.5 Funkční monomer dopamin

Dopamin (DA) je jedním z funkčních monomerů, který se používá pro vytvoření vrstvy MIPs. Jedná se o malou molekulu ze skupiny katecholaminů, která podléhá oxidační polymeraci za alkalických podmínek a vytváří vrstvu polydopaminu (PDA). Proces polymerace dopaminu je znázorněn na obrázku 6 [20, 21]. Interakce mezi vrstvou PDA a templátem jsou utvářeny prostřednictvím nekovalentních interakcí, jako jsou například interakce vodíkových vazeb, interakce  $\pi$ - $\pi$  a elektrostatické interakce [20]. Další výhodou DA je, že umožňuje vytvářet polymerní síť bez přídavku zesíťovacího činidla. Tato skutečnost zjednodušuje proces syntézy MIPs. Dopamin obsahuje mnoho funkčních skupin (jako jsou fenylové, aminové a hydroxylové skupiny), které jsou schopné reagovat s templátem, je hydrofilní, ekologický, biodegradabilní a biokompatibilní. Tyto vlastnosti z něj činí vhodný materiál pro imprinting různých molekul. Navíc vrstva PDA vytvořená na povrchu nosiče má dobrou stabilitu a trvanlivost v různých prostředích (kromě silně alkalických roztoků, které mají pH vyšší než 13) [22, 23]. Po zvážení všech kladů, byl DA využit pro přípravu MIPs v této práci.



Obrázek 6: Mechanismus polymerace dopaminu a tvorby polydopaminu v alkalickém prostředí [24]

### 2.1.6 Templát

V procesu přípravy molekulově imprintovaných materiálů hraje velkou roli templát (otiskovaná molekula, resp. analyt). Na základě molekulární struktury templátu musí být zvolen vhodný typ funkčního monomeru, který se následně použije při syntéze. Chemické vazby, které vznikají mezi templátem a funkčním monomerem určují výslednou selektivitu molekulárního rozpoznávání. Templát by měl za podmínek polymerace splňovat tři základní požadavky. Prvním je, že nesmí obsahovat skupiny podílející se na polymerizaci nebo jí bránit. Druhý požadavek je, že templát musí vykazovat vynikající chemickou stabilitu. Posledním požadavkem je, aby funkční monomer obsahoval funkční skupinu, která umožní interakci s templátem [25, 26].

V současné době lze imprintovat celou škálu templátů od iontů, přes malé molekuly až po velké struktury, jakou jsou viry, bakterie nebo částice. Nejčastěji se však používají jako templát sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností (cukry, steroidy, deriváty aminokyselin, léčiva, pesticidy) [27], protože příprava MIPs selektivních pro makromolekuly (proteiny, viry, bakterie) je komplikovanější než v případě malých molekul. Přípravu komplikují nejméně dva faktory, a to sterický a termodynamický [27]. V důsledku **sterického faktoru** dochází k tomu, že objemné (proteinové) templáty nemohou proniknout do nitra a z nitra polymerní sítě [28]. Druhým problémem je **termodynamický faktor**, který

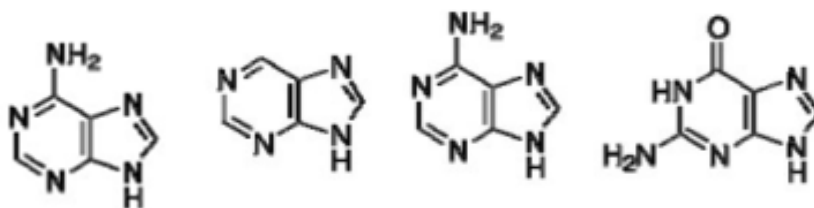
je zapříčiněn nestabilitou použitých templátů (proteiny, polypeptidy), kdy dochází k vytvoření špatně definovaných rozpoznávacích míst ve vytvořeném polymerním materiálu [29].

Tato bakalářská práce byla zaměřena na molekulový imprinting vybrané nukleové báze (uracil). Jelikož jsou nukleové báze jednou z klíčových biomolekul v živých organismech, je jejich detekce a stanovení v různých více či méně složitých maticích v zájmu mnoha vědních oborů (např. biochemie, molekulární biologie, medicína). Imprintingem nukleových bází se jako první zabývali prof. Spivak a Shea v roce 1998 [30]. MIPs byly připraveny z kyseliny methakrylové a ethylenglykoldimethakrylátu jako zesíťovacího činidla. Proces navázání analytu na polymerní vrstvu byl hodnocen chromatograficky. Tímto postupem byla vytvořena specifická vazba pro deriváty adeninu, cytosinu a guaninu. Tyto báze obsahují ve své struktuře 2-aminopyridinovou substrukturu, která byla nezbytná pro selektivní rozpoznání nukleové báze. U derivátů thyminu a uracilu, které tuto substrukturu neobsahují, nedocházelo k selektivnímu rozpoznávání. V roce 2007 byl prof. Sreenivasanem publikován článek, v němž popsal přípravu molekulově imprintovaných materiálů selektivních pro čtyři nukleové báze (thymin, uracil, cytosin a adenin) tvořených polyanilinem [26].

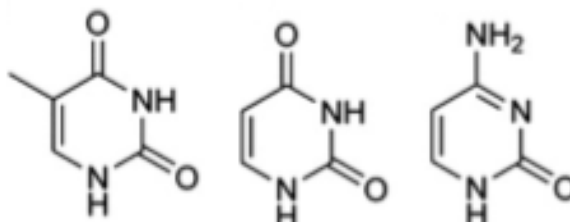
### 2.1.7 Nukleové báze

Nukleové báze jsou podjednotky nukleotidů, což jsou monomery nukleových kyselin, které nesou genetickou informaci.

Adenin (A), cytosin (C), guanin (G), thymin (T) a uracil (U) jsou heterocyklické sloučeniny, které obsahují ve své struktuře vzhledem ke své hmotnosti velké množství dusíku. A a G se řadí mezi **purinové báze** (Obrázek 7). Tyto báze jsou odvozené od purinu, který je tvořen kondenzovaným pyrimidinovým a imidazolovým kruhem. Zatímco C, T a U patří mezi **pyrimidinové báze** (Obrázek 8). Pyrimidiny jsou molekuly tvořené šestičlenným uhlíkovým kruhem a dvěma atomy dusíku [31].



Obrázek 7: Purin, adenin, guanin [32]



Obrázek 8: Thymin, uracil a cytosin [26, 33]

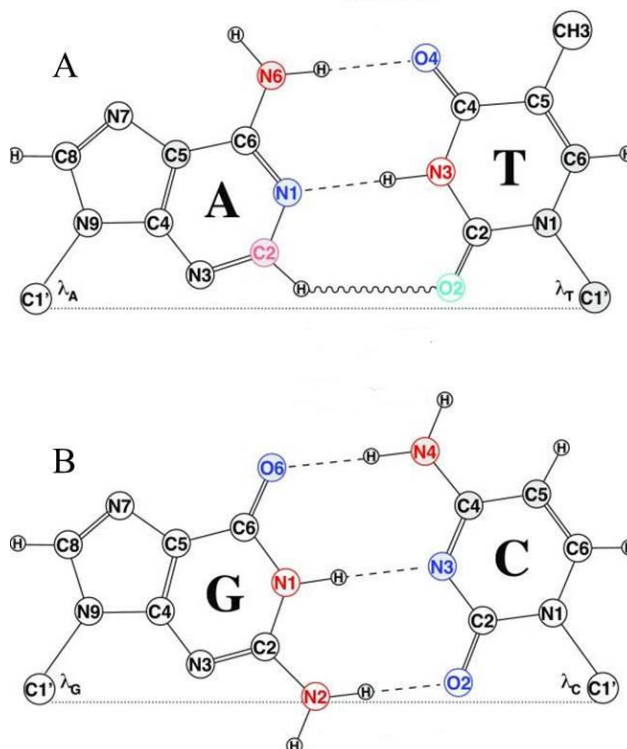
### 2.1.8 Uracil

Uracil se řadí mezi pyrimidinové nukleové báze. Vyskytuje se převážně v řetězcích RNA, ale může se objevit i v DNA některých bakterií a virů. Uracil stejně jako thymin, ze kterého může v organismu vznikat metylací [34].

Uracil se může uplatnit v řadě průmyslových odvětví, mezi která patří například lékařství. V lékařství se dá použít například pro diagnostiku nádorových onemocnění nebo AIDS. Prof. Chang a jeho výzkumný tým se zabývali studiem uracilu a jeho inhibičními účinky na produkci melaninu, který hraje významnou roli při ochraně pokožky proti škodlivému ultrafialovému záření [35, 36]. Další studie se zaměřila na spojení problematiky onemocnění AIDS a uracilu. Tým prof. Yan zjistil, že uracil může podporovat prvotní fázi životního cyklu viru HIV. U pacientů nakažených tímto virem bylo tedy prokázáno zvýšené množství uracilu [37].

Další průmyslové odvětví, ve kterém se může uracil uplatnit je potravinářský průmysl. V současné době je bakteriální kontaminace potravin velmi rozšířeným problémem, který ohrožuje lidské zdraví [38]. Jako indikátory bakteriální kontaminace se v současné době využívají kyselina octová a kyselina mléčná, které jsou bakteriálními metabolity. Bohužel tyto látky mohou být degradovány v technologických fázích přípravy a výroby potravinového produktu. Z tohoto důvodu je snaha najít nové indikátory, které budou termostabilní. Jako vhodná alternativa k současným indikátorům se jeví uracil, který je zkoumán jako možný termostabilní indikátor bakteriální kontaminace v potravinách, jako jsou vejce [39], rajčata [40] nebo kozí mléko [41]. Uracil se v potravinách přirozeně vyskytuje, pouze ve formě uridinu, což je molekula složená z uracilu a ribózy, které jsou navzájem spojené N-glykosidickou vazbou. Dojde-li k bakteriální kontaminaci, pak je uridin bakterií metabolizován na uracil. Bakteriální kontaminace může tedy být indikována nárůstem koncentrace uracilu vznikajícího v důsledku štěpení uridinu způsobeného hydrolytickou aktivitou bakterií. První experimenty, při kterých byl uracil využit, jako indikátor kvality potravin proběhly v roce 1986, kdy prof. Morris pozoroval při separaci zkažených vaječných produktů vysoký nárůst uracilu [39]. Nárůst koncentrace uracilu byl pozorován také u kontaminovaného kozího mléka [41]. Podobný pokus vyzkoušel také prof. Hidalgo na rajčatové šťávě, kterou naočkoval několika mikroorganismy. U všech vybraných mikroorganismů následně potvrdil hydrolytickou aktivitu a zaznamenal nárůst koncentrace uracilu a pokles uridinu [40, 42]. Nukleové báze mezi sebou vytvářejí dvojice tzv. komplementární páry. Tyto páry jsou tvořeny vždy jednou purinovou a jednou pyrimidinovou bází, které se vzájemně interagují prostřednictvím vodíkových můstků (Obrázek 7) [43].





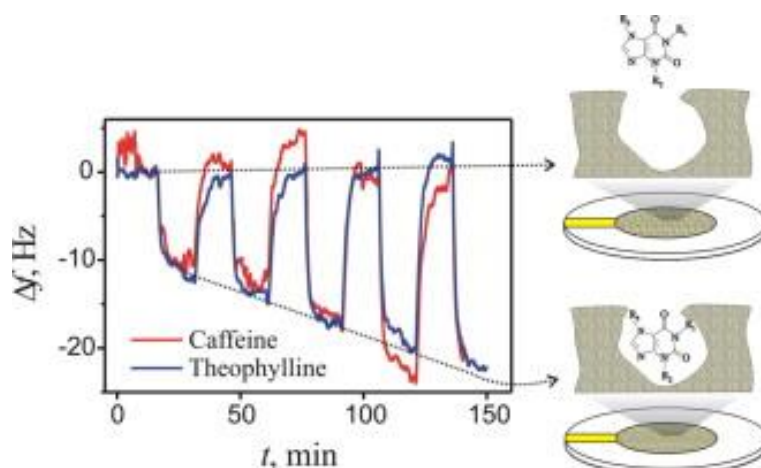
Obrázek 9: A) interakce, ke kterým dochází mezi nukleovými bázemi adeninem a tyminem. B) vazby mezi guaninem a cytosinem. Vodíkové vazby jsou v obou případech označeny přerušovanými čarami, vazba CH–O páru mezi adeninem a tyminem je znázorněna tenkou vlnkovanou čarou. Konvenční donorové a akceptorové atomy protonu jsou označeny červeně a modře. [43]

## 2.2 Metody detekce

Existuje celá řada metod, které mohou být využity pro detekci analytu navázaného na MIPs. Mezi nejčastěji používané metody patří křemenné krystalové mikrováčky (QCM), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPCL), elektrochromatografie (CEC) a kapilární elektroforéza (CE).

### 2.2.1 QCM

Metoda QCM se stala během desetiletí velmi využívanou metodou jak pro klinické a biologické stanovení, tak pro zkoumání interakcí biomolekul. Metoda je založena na piezoelektrických vlastnostech křemenného krystalu [44, 45]. Na křemenném krystalu se nachází dvě elektrody. Na elektrody je přiváděno střídavé elektrické napětí, vyvolávající mechanické kmity se stabilní frekvencí. Ze změny frekvence je možno určit změnu hmotnosti vztaženou na jednotku plochy, což je patrné z obrázku 10, kde byl stanovován kofein a theophylline [46]. Tato metoda umožňuje velmi citlivé měření hmotností, a to až na hodnotu 0,1 ng. Také je vhodná i pro měření v komplexním i opticky neprůhledném roztoku. Velkou výhodou taktéž je, že umožňuje stanovení jednotlivých vzorků při velmi nízkých finančních nákladech [47, 48]. V dnešní době se nejvíce používá k detekci širokého rozsahu látek, od malých molekul přes viry až k celým buňkám, jako jsou bakteriální a eukaryotické buňky [45].



Obrázek 10: Princip detekce navázaného analytu na MIP za použití QCM [49]

### 2.2.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Další metoda, která se používá pro stanovení MIPs, je kapalinová chromatografie. Základním principem chromatografie je rozdělení neznámého vzorku mezi dvě fáze, kde jedna je pohyblivá (mobilní) a druhá nepohyblivá (stacionární). Používá se hlavně ke stanovení průměrné molekulové hmotnosti, distribuci molekulové hmotnosti, složení heterogenity v případě kopolymerů, nebo k separaci enantiomerů [50].

### 2.2.3 Kapilární elektrochromatografie

Pro detekci navázaného analytu je možné použít i metodu CEC. Je to separační metoda založená na spojení kapalinové chromatografie a kapilární zónové elektroforézy. CEC si zachovává výhody obou metod, ze kterých vychází. Výhody pocházející z kapilární zónové elektroforézy jsou vyšší účinnost a jednoduchost instrumentace. Výhody pocházející z kapalinové chromatografie jsou vyšší selektivita a kapacita kolony, které jsou dány stacionární fází jako v HPLC. U CEC dochází k separaci analytu převážně dvojím mechanismem. Elektroneutrální i ionizované látky jsou stejně jako v chromatografii, separovány na základě rozdílných interakcí se stacionární fází, kde molekulově imprintované polymery slouží jako stacionární fáze. Látky ionizované se navíc pohybují také vlivem elektrického pole rychlostí, která je dána jejich efektivními mobilitami, to také vede k větší selektivitě vlastní separace [51].

### 2.2.4 Kapilární elektroforéza

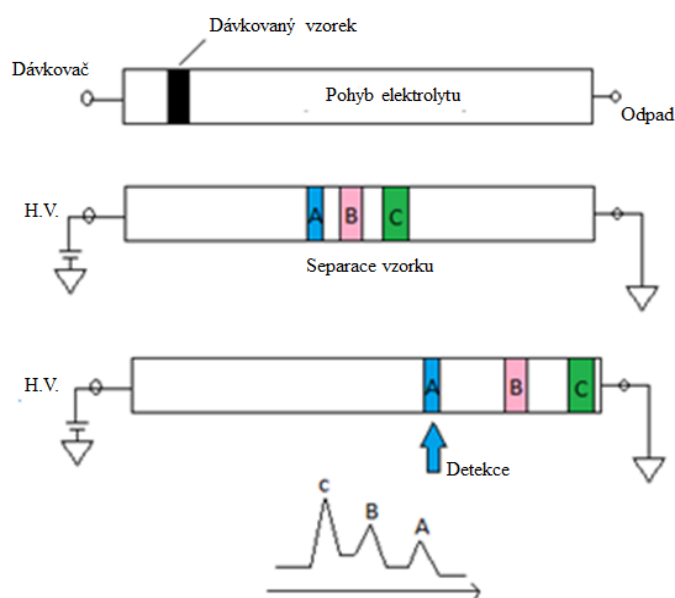
Kapilární elektroforéza je metoda, pomocí které byl stanovován navázaný analyt v této bakalářské práci, proto jí byla věnována větší pozornost.

První kapilární elektroforetické analýzy byly představeny v padesátých letech minulého století prof. Hjertenem, který použil elektroforézu s rotační trubicí (křemenná kapilára s větším vnitřním průměrem – cca 3 mm). Zóny byly stabilizovány pomalým rotačním pohybem elektroforetické trubičky kolem podélné osy [52]. Tento přístup však nebyl moc efektivní, což vedlo v roce 1981 k objevu prof. Jorgensona a Luckacsové, kteří vytvořili skleněné kapiláry s vnitřním průměrem 75  $\mu\text{m}$  [53, 54].

Metoda kapilární elektroforézy je rozdělena na několik dalších technik např. zónová kapilární elektroforéza, která byla využita při měření této práce, dále izotachoforéza, kapilární

izoelektrická fokusace, micelární elektrokinetická kapilární chromatografie, kapilární gelová elektroforéza a kapilární elektrochromatografii [52].

Kapilární zónová elektroforéza (CE) je elektromigrační metoda, sloužící k separaci různých sloučenin na základě rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli. Separace se provádí v křemenné kapiláře. Princip separace je založený na rychlosti pohybu iontů v elektrickém poli. Molekuly se oddělují v různých zónách, které lze detekovat pomocí optických, elektrochemických nebo hmotnostních detektorů, jak je znázorněno na obrázku 11 [55]. Pomocí této metody lze analyzovat komplexní makromolekuly, jakou jsou proteiny, dále nukleové kyseliny, organické látky, či dokonce ionty. [52]. Na obrázku 11 je v nejhornější části znázorněno dávkování vzorku do kapiláry, prostřední obrázek znázorňuje separaci vzorku a na spodní části obrázku je znázorněna detekce separovaných složek.

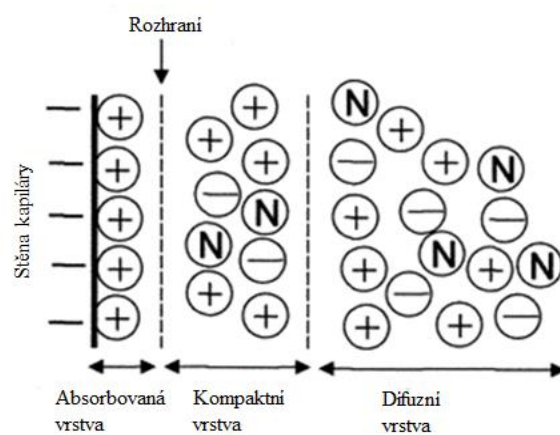


Obrázek 11: Princip kapilární elektroforézy [55]

#### 2.2.4.1 Elektroosmotický tok

Elektromigrační techniky jako jsou CE a CEC využívají dvou jevů: elektroforetické migrace iontů v elektrickém poli a elektroosmotického toku (EOF) kapaliny kapilárou [56]. Na obrázku 12 je znázorněna vnitřní stěna křemenné kapiláry, která se nabije záporným nábojem v důsledku bazicity pufru, kterým je kapilára naplněna (pufr jí odštěpí vodíky). Pozitivní ionty (kationty) jsou přitahovány k záporně nabitému vnitřnímu povrchu kapiláry za vzniku elektrické dvojvrstvy. Po celé délce kapiláry v elektrickém poli migrují kationty v difuzní části elektrické dvojvrstvy směrem k záporné elektrodě (katodě). Vzhledem k tomu, že kationty jsou hydratovány, vyvolávají tak objemový tok roztoku vzorku uvnitř kapiláry směrem ke katodě [57]. Tomuto jevu se říká EOF.

Obecně platí, že většina analytů separovaných pomocí CE má elektroforetickou migraci (pohyb iontů v elektrickém poli, při kterém dochází k přitahování iontů k opačně nabitě elektrodě) menší než EOF. To umožňuje současně stanovit pozitivně i negativně nabitě látky. [57]. EOF je ovlivňován iontovou silou [58] nebo viskozitou [59] separačního pufru.



Obrázek 12: Elektrické dvojvrstva na povrchu křemenné kapiláry [60]

### **3 CÍLE PRÁCE**

1. Základní rešerše o principu a využitelnosti molekulově imprintovaných polymerů
2. Příprava a optimalizace molekulově imprintovaného polymeru selektivního pro zvolenou nukleovou bázi
3. Ověření selektivity připraveného materiálu a izolace nukleové báze z reálného vzorku
4. Vyhodnocení vlastností připravených imprintovaných materiálů

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiály

Kyselina octová 99,8 % byla zakoupena od firmy Penta (CZ). Dodecylsírán sodný  $\geq 99$  %, dopamin hydrochlorid  $\geq 99$  %, dodekahydrát tetraboritan sodný  $\geq 99,5$  %, TRIZMA báze  $\geq 99,8$  %, uracil  $\geq 99$  %, hydroxid sodný  $\geq 97$  % byly zakoupeny od firmy Sigma aldrich (USA).

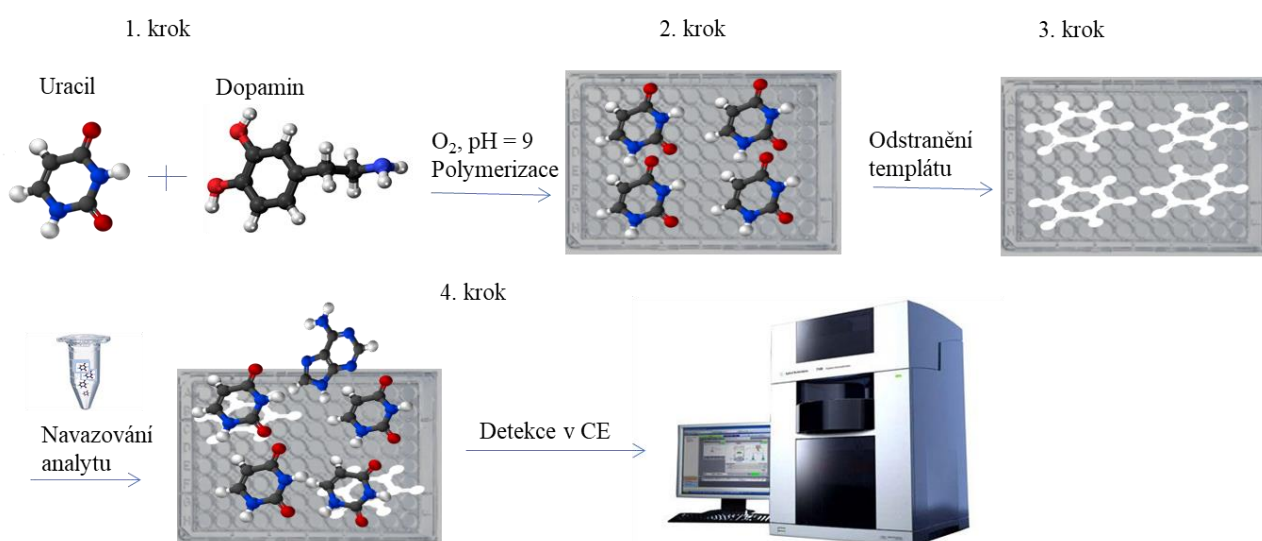
### 4.2 Přístrojové vybavení

Agilent Technologies 7100 Capillary Electrophoresis

### 4.3 Popis experimentu

Bakalářská práce je zaměřena na vývoj metody, která bude schopná detekovat nukleové báze, (konkrétně uracil) z komplexních vzorků za použití syntetických receptorů – MIPs. Klíčovou částí je příprava MIPs specifických pro uracil. Příprava se skládá z několika kroků (Obrázek 13) přičemž téměř v každém kroku byla nezbytná optimalizace:

1. V prvním kroku se smísí templát (otiskovaná molekula) a funkční monomer (dopamin) mezi nimiž dochází k tvorbě specifické interakce – zde bylo nezbytné optimalizovat poměr templátu a funkčního monomeru
2. Ve druhém kroku začne docházet k polymeraci funkčního monomeru za vzniku molekulově imprintované polymerní vrstvy
3. Ve třetím kroku je templát odstraněn z polymerní matrice – optimalizace vhodného promývacího roztoku
4. V posledním kroku je již vznik MIP dokončen a může být použit pro interakci se vzorkem obsahujícím analyt. Analyt selektivně extrahovaný je poté z povrchu MIP eluován a detekován pomocí zónové kapilární elektroforézy s UV-Vis absorpčním detektorem ( $\lambda=260$  nm) – nezbytná je optimalizace separačních podmínek kapilární elektroforézy.



Obrázek 13: Schéma procesu přípravy MIPs a jejich využití

## **4.4 Metody**

### **4.4.1 Příprava MIPs a NIPs**

MIPs a NIPs (molekulově neimprintovaný polymer) byly připraveny v mikrotitrační destičce. Před samotnou přípravou byla destička promyta 75 % ethanolem a vysušena dusíkem. Pro přípravu MIPs byl smísen dopamin (funkční monomer) o koncentraci 5 mg/ml rozpuštěný ve 20 mM TRIS (pH 8,5) a uracil (0,25 mg/ml) rozpuštěný v 40 mM borátovém pufru o pH = 10,5 v poměru 1:1. Pro přípravu NIPs byl použit místo uracilu pouze 40 mM borátový pufr o pH = 10,5. Do každé jamky v destičce bylo pipetováno 50  $\mu$ l směsi. Polymerizační reakce probíhala přes noc při laboratorní teplotě (přibližně 16 hodin). Po ukončení polymerizačního kroku byl templát vymyt z polymerní vrstvy třikrát 50  $\mu$ l 40 mM borátového pufru o pH = 10,5. Takto připravené polymery bylo možné použít pro izolaci analytu (navazovaná molekula) z komplexního vzorku.

### **4.4.2 Metoda separace a detekce nukleových kyselin**

Pro separaci nukleových bází byla použita kapilární elektroforéza 7100 (Agilent Technologies, Německo) s absorpční detekcí. Všechny nukleové báze mají ve struktuře alespoň jeden aromatický kruh, to znamená, že jsou schopny absorbovat UV záření ideálně s vlnovou délkou v rozmezí 250-270 nm [61]. Proto byla pro detekci zvolena vlnová délka 260 nm. Separace probíhala v kapiláře z taveného oxidu křemičitého s vnitřním průměrem 75  $\mu$ m, celkovou délkou 64,5 cm a účinnou délkou 56 cm. Jako základní elektrolyt byl použit 40 mM borátový pufr o pH = 9,8. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky při tlaku 40 mbar po dobu 5 s. Vložené napětí bylo 20 kV. Před každou analýzou byla kapilára promyta po dobu 100 sekund roztokem základního elektrolytu.

### **4.4.3 Optimalizace promývacího roztoku**

Jako promývací roztok byly vyzkoušeny následující látky:

- 40 mM borátový pufr (pH = 10,5)
- 0,1 M hydroxid sodný (pH = 12,1)
- 5% kyselina octová (HAc) a 1 % dodecylsírán sodný (SDS) (pH = 2,3)
- 10 % HAc (pH = 2,2)

Pro optimalizaci promývání bylo použito 50  $\mu$ l promývacího roztoku. Uvolněný templát byl detekován pomocí CE-UV. Z naměřených dat byla vypočítána procentuální schopnost zvoleného promývacího roztoku vymýt templát.

### **4.4.4 Optimalizace koncentrace dopaminu**

Pro přípravu MIPs byl smísen dopamin o koncentraci 5 nebo 4 mg/ml suspendovaný ve 20 mM TRIS (pH 8,5) a uracil (0,25 mg/ml) rozpuštěný v 40 mM borátovém pufru o pH = 10,5 v poměru 1:1. Pro přípravu NIPs byl použit 40 mM borátový pufr o pH = 10,5 bez obsahu uracilu. Po polymeračním a promývacím kroku byla hodnocena schopnost připravených MIPs vázat analyt.

### **4.4.5 Adsorpční vlastnosti MIPs a NIPs**

Adsorpční vlastnosti MIPs a NIPs byly hodnoceny na základě experimentů ověřujících vazebné vlastnosti, vazebnou kinetiku a selektivitu. Všechny experimenty byly opakovány třikrát a hodnota uvedená v grafu je průměrnou hodnotou těchto tří měření.

Pro zkoumání **vazebných vlastností** bylo k MIPs nebo NIPs přidáno 50  $\mu$ l uracilu o různých počátečních koncentracích (1,56; 0,78; 0,36; 0,18 a 0,09 mM). Po 30 minutách při laboratorní teplotě byl supernatant obsahující nenavázaný uracil odebrán, navázaný uracil byl uvolněn 50  $\mu$ l 40 mM borátového pufru o pH = 10,5 a detekován pomocí CE s UV-Vis absorpční detekcí.

Pro vyhodnocení **vazebné kinetiky** byly připravené MIPs a NIPs ponechány v kontaktu s roztokem 0,5 mM uracilu po dobu 5 až 45 minut. Po uplynutí této doby byl roztok uracilu odebrán a nevázaný uracil byl vymyt. Navázaný uracil byl odstraněn optimalizovaným postupem a proměřen na CE.

V experimentech prokazujících selektivitu připraveného polymerního materiálu byly nukleové báze cytosin, tymin, adenin a guanin použity jako kompetitor uracilu. Experiment byl prováděn následovně: na MIPs/NIPs bylo naneseno 50  $\mu$ l 2 mM roztoku vybrané nukleové báze suspendované ve 40 mM borátovém pufru (pH 10,5). Po 20 minutách byl supernatant odebrán a navázaný kompetitor byl odstraněn optimalizovaným postupem a analyzován kapilární elektroforézou. Naměřená data byla porovnána s údaji získanými z měření s uracilem, který byl navazován za stejných podmínek.

#### 4.4.6 Homogenizace potravin

Jako reálný vzorek byly použity: rajče soudkové (zakoupeno v obchodním řetězci Albert, země původu Španělsko), rajčatový protlak (zakoupeno v obchodním řetězci Lidl, země původu Itálie) a rajská rajčatová polévka (zakoupeno v obchodním řetězci Billa, firma Maggi, země původu Slovenská republika). Jednotlivé vzorky byly připraveny podle následujícího postupu:

Rajče soudkové – čtvrtina rajčete byla rozmělněna v třecí misce, ředěna 2 ml 40 mM borátového pufru (pH = 10,5). Roztok byl následně filtrován přes Syringe Filtr (velikost póru 0,45  $\mu$ m).

Rajčatová polévka byla připravena podle návodu uvedeného výrobcem. Stručně, polévková směs byla zalita 200 ml horké vody. Polévka byla použita po vychladnutí na laboratorní teplotu.

Rajčatový protlak - 280 mg protlaku bylo ředěno 2,5 ml 40 mM borátového pufru (pH = 10,5).

#### Inokulace rajského protlaku bakterií

Bakteriální kmeny *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulganicus* NCTC 8511 a *Lactobacillus acidophilus* ATCC 11700 (Česká sbírka mikroorganismů, Brno, Česká republika) byly kultivovány v Muller-Hinton bujónu (MHB; Oxoid, Hampshire, UK) přes noc při 37 °C a 150 ot/min. Koncentrace bakteriálních roztoků byly stanoveny optickou hustotou při 600 nm a pomocí MHB byly kultury upraveny na koncentraci  $10^6$  CFU  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>.

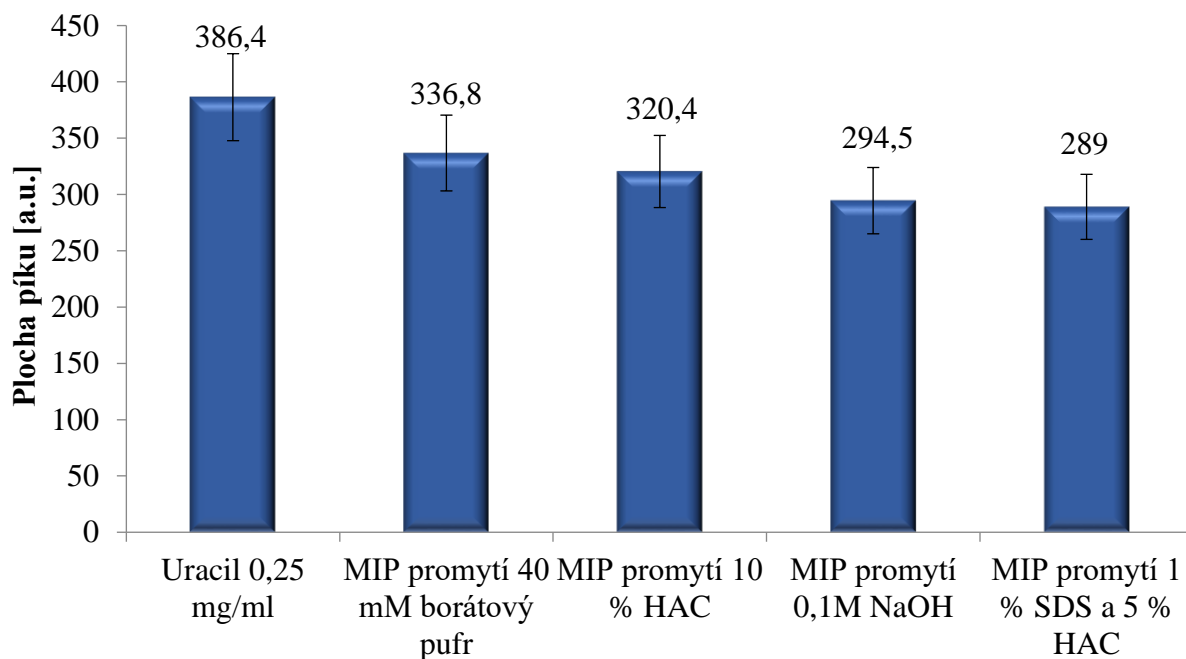
Následně bylo do dvou mikrozkušavek odváženo stejné množství rajčatového protlaku o hmotnosti 1 g a přidáno 10  $\mu$ l kultury bakterie (*Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulganicus*, *Lactobacillus acidophilus*). Obě směsi byly ponechány jeden den v termobloku při teplotě 38 °C. Druhý den byla směs protlaku infikována bakterií zředěna 20 mM TRIS (pH = 8,5) na koncentraci 250 mg/ml. Takto ředěný inokulovaný protlak byl navazován na MIPs a NIPs a následně měřen výše optimalizovaným postupem.



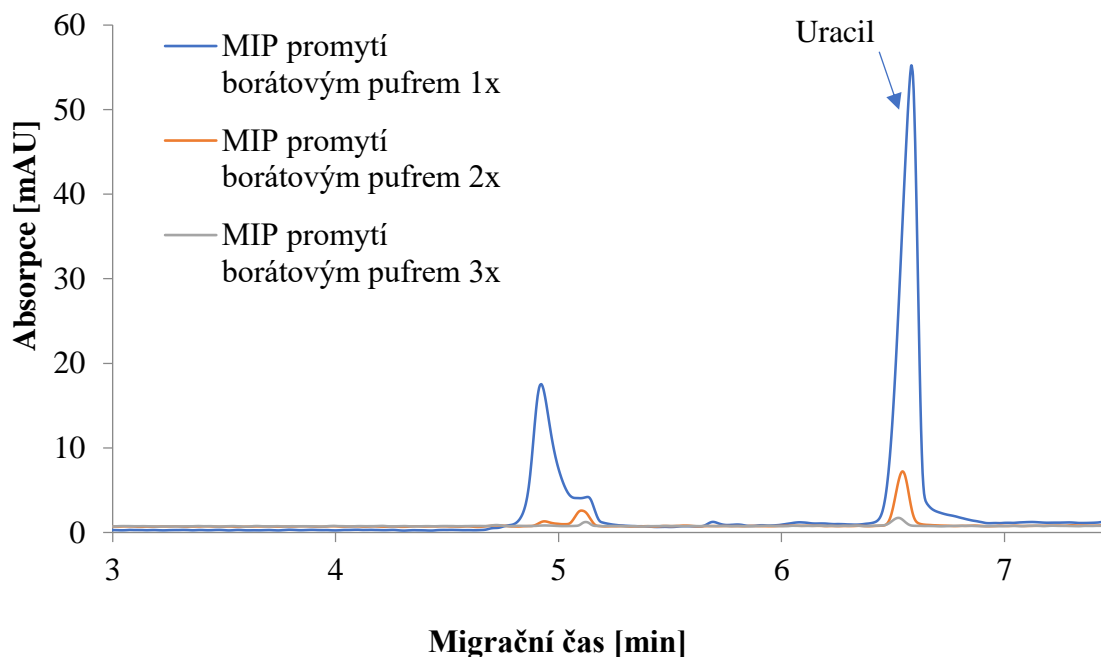
## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Optimalizace promytí

V procesu přípravy MIPs je velmi důležitý krok odstranění otiskované molekuly – templátu. V tomto kroku je templát vymyt z polymerní vrstvy za vzniku materiálu s rozpoznávacími místy selektivními pro takto otiskovanou molekulu [62]. V průběhu odstraňování templátu může dojít ke kolapsu vazebných míst v důsledku jeho odstranění z polymerní matrice. Rozpoznávací místa v polymerní vrstvě mohou také změnit svoji strukturu v důsledku změny rozpouštědla, které může způsobit bobtnání polymeru apod. [63]. Proto je výběr promývacího roztoku vhodného pro odstranění templátu klíčový. Pro vymytí templátu byly použity čtyři různé promývací roztoky: 40 mM borátový pufr (pH 10,5); 0,1 M hydroxid sodný (pH 12,1); 10 % kyselina octová (HAc) (pH 2,2) a 1 % dodecylsíran sodný (SDS) s 5 % HAc (pH 2,3). Získaná data jsou zaznamenána v grafu 1. Z grafu je patrné, že nejvhodnějším promývacím roztokem byl 40 mM borátový pufr, který umožnil vymytí 91 % templátu vázaného v polymerní vrstvě již v prvním kroku. Ostatní promývací roztoky vykazovaly nižší účinnost, což mohlo být způsobeno příliš kyselým pH v případě octové kyseliny nebo příliš bazickým v případě hydroxidu. Dále bylo zkoumáno, kolik promývacích kroků je nezbytných k odstranění veškerého templátu (Graf 2). Z naměřených dat vyplývá, že při prvním promytí se odstraní největší množství templátu (91 %), při druhém promytí bylo odstraněno 8 % a při třetím bylo vymyto zbývající 1 % templátu.



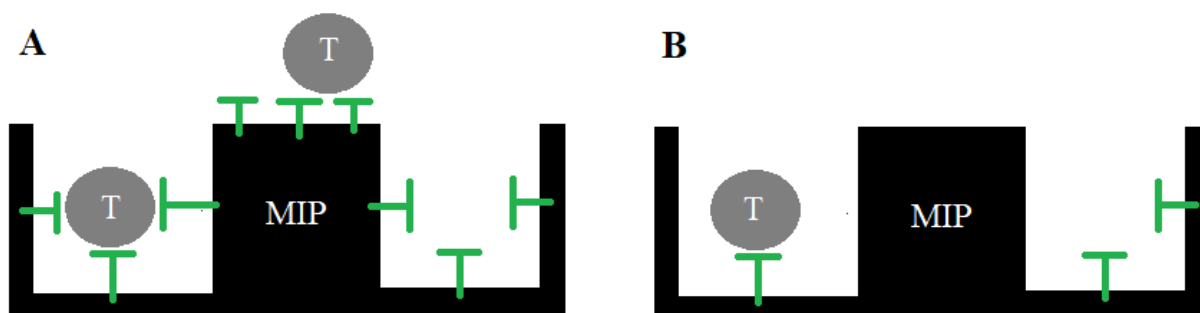
Graf 1: Optimalizace výběru vhodného promývacího rozpouštědla



Graf 2: Optimalizace opakování promývacího kroku

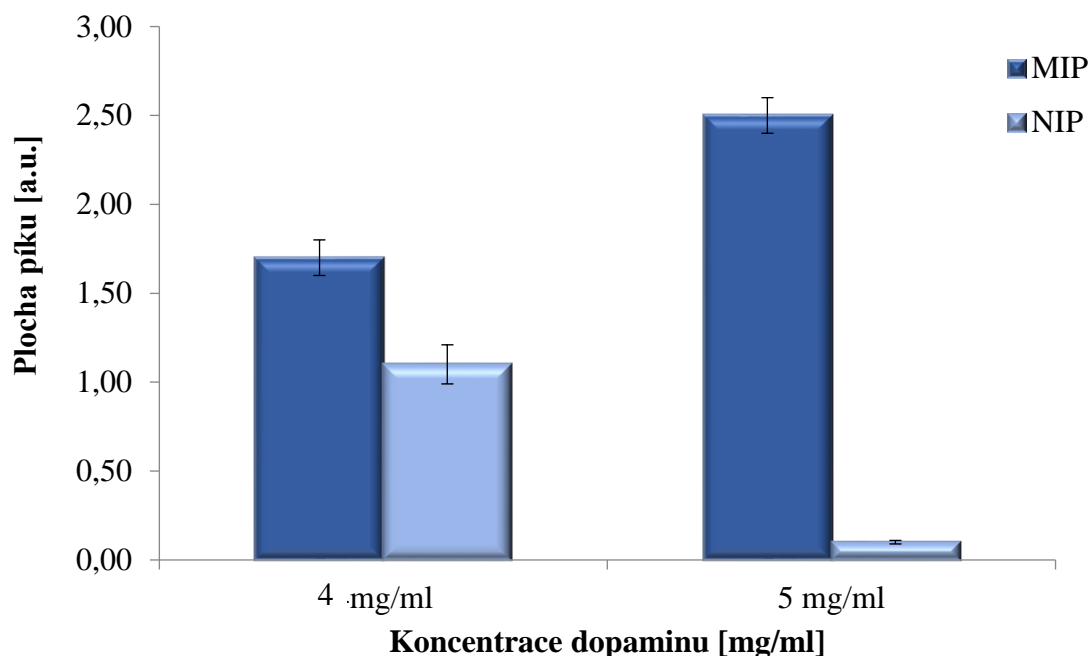
## 5.2 Optimalizace koncentrace funkčního monomeru (dopamin)

Koncentrace funkčního monomeru (FM) výrazně ovlivňuje kvalitu připravených MIPs, proto je velmi důležité zvolit jeho vhodnou koncentraci. Pro lepší představu je na obrázku 14 znázorněn model vlivu koncentrace FM na kvalitu MIPs. Příliš vysoká koncentrace FM zvyšuje tvorbu nespecifických vazeb, což je dáno přítomností volných funkčních skupin monomeru mimo oblast kavit (Obrázek 14, A). Na druhou stranu příliš nízká koncentrace FM se vyznačuje nedostatkem volných funkčních skupin nezbytných pro interakci s templátem a dochází k snížení selektivních vlastností připraveného polymeru (Obrázek 14, B). Obecně platí, že poměr mezi templátem a FM by se měl pohybovat v rozmezí 0,5–0,25. Uracil však obsahuje čtyři funkční skupiny, které mohou s dopaminem interagovat, proto je poměr mezi templátem a FM v našem případě nižší (0,03). Pro optimalizaci MIPs byly zvoleny dvě různé koncentrace dopaminu 4 mg/ml a 5 mg/ml, přičemž koncentrace uracilu zůstávala konstantní (0,125 mg/ml). Naměřená data jsou zaznamenána v grafu 3.



Obrázek 14: Vliv koncentrace FM na kvalitu MIPs. A) vysoká koncentrace FM; B) nízká koncentrace FM

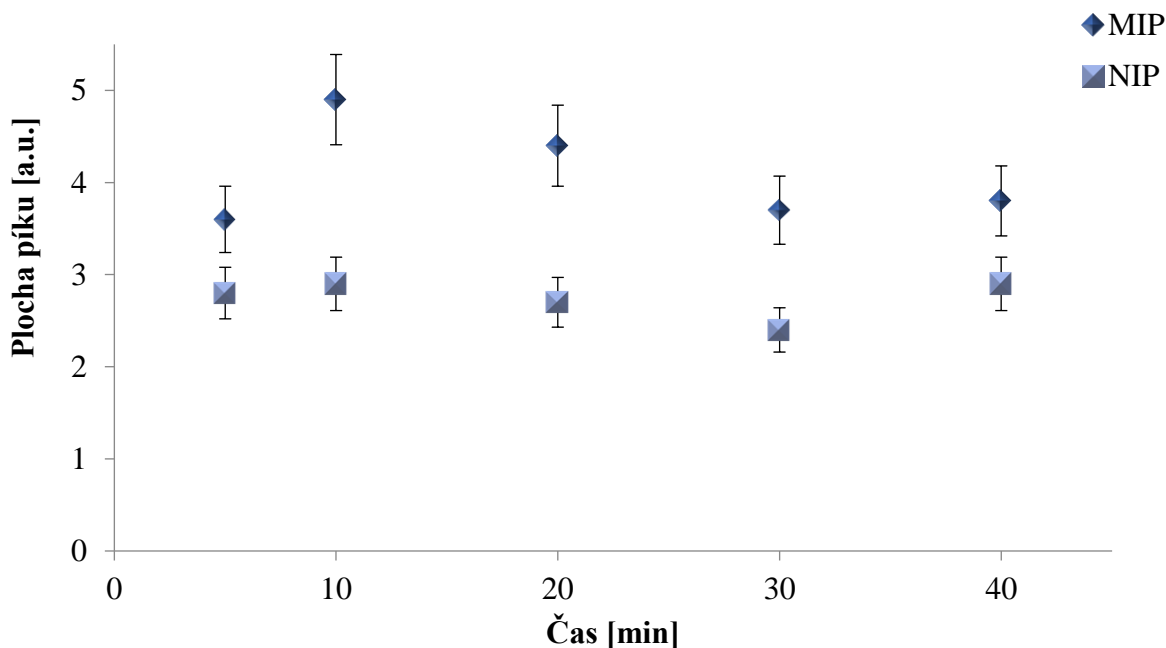
Z grafu je patrné, že v případě koncentrace 4 mg/ml byly vytvořené MIPs málo selektivní. Při koncentraci 5 mg/ml byly nízké nespecifické interakce a vysoká selektivita, proto byla tato koncentrace využita i při dalších experimentech.



*Graf 3: Optimalizace koncentrace dopaminu*

### 5.3 Kinetika adsorpce

Pro vyhodnocení doby, po kterou je nutné navazovat analyt, byl proveden experiment, ve kterém byly připravené MIPs a NIPs ponechány v kontaktu s roztokem 0,5 mM uracilu po dobu 5 až 40 minut. Po zvolené době byl roztok uracilu odebrán a nevázaný uracil byl vymyt 40 mM borátovým pufrem. Navázaný uracil byl odstraněn optimalizovaným postupem a měřen pomocí CE. Výsledky jsou uvedeny v grafu 4. Z naměřených dat je vidět, že signál uracilu významně vzrůstá s rostoucí dobou akumulace a po 10 minutách systém dosahuje rovnováhy. Další zvýšení doby, po kterou analyt interaguje s MIPs, již nevede k vyššímu signálu. Jako doba, která umožňuje maximální nasycení povrchu MIPs analytem, bylo zvoleno 20 minut. Při této době si můžeme být jisti, že analyt měl dostatek času k navázání na povrch polymeru a zároveň, že nedocházelo k vazebné neselektivitě, která byla pozorována při dlouhodobějším ponechání analytu s polymerem.

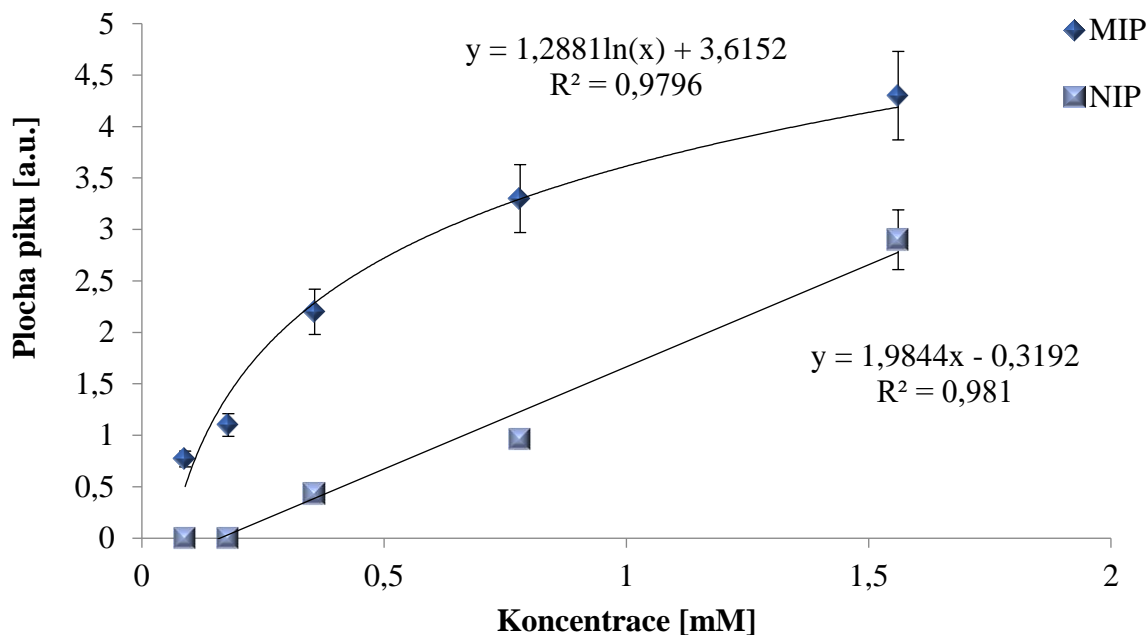


Graf 4: Časová závislost adsorpce uracilu na MIP a NIP

#### 5.4 Ověřování vazebných vlastností

Vazebné experimenty byly prováděny při různých počátečních koncentracích uracilu v rozmezí od 0,08 do 1 mM. Následně byla porovnána vazebná kapacita MIPs proti NIPs, které slouží jako indikátory neselektivní interakce. Z naměřených dat znázorněných v grafu 5 je vidět, že MIPs váží ve srovnání s NIPs přibližně 5krát více uracilu. Je také zřejmé, že adsorbované množství uracilu se zvyšuje s jeho rostoucí počáteční koncentrací. Bohužel s rostoucí počáteční koncentrací uracilu dochází i k nárůstu nespecifických interakcí. Imprintovaný polymer je nasycen, když koncentrace uracilu dosáhne 1 mM koncentrace. Metoda založená na izolaci uracilu pomocí MIPs a následnou detekcí na CE umožňuje detekci uracilu v lineárním rozsahu ( $R^2 = 0,96$ ) 0,08 – 0,8 mM s detekčním limitem 3  $\mu\text{g/ml}$ .

V současné době patří mezi nejčastěji používané metody pro detekci uracilu vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPCL). Tato metoda má ve srovnání s CE, která byla používána pro detekci uracilu v této práci, nižší limity detekce (0,7 – 1,2  $\mu\text{g/ml}$ ). Nicméně mikroorganismy o koncentraci  $10^6$  CFU/ml jsou schopni vyprodukovat 150  $\mu\text{g/ml}$  uracilu. Evropské legislativní limity pro těkavé kyseliny (jako je kyselina octová a mléčná) jsou 0,4 g/l (EEC. Nařízení (EHS) 1764/86, 27. května 1986, Komise. J. Eur. Community 1986, L 153, 1-17.), což odpovídá koncentraci mikroorganismů  $10^7$  CFU/ml [43]. To znamená, že navzdory horším detekčním limitům je stále možné detekovat vyvinutou metodou velmi nízkou bakteriální kontaminaci. Mezi výhody vyvinutého přístupu patří velmi jednoduchá izolace studované molekuly bez komplikovaného zpracování komplexního vzorku (centrifugace, třepání, filtrace apod.) a velmi nízká spotřeba vzorku v izolačním (50  $\mu\text{l}$ ) i v detekčním kroku (několik nl).

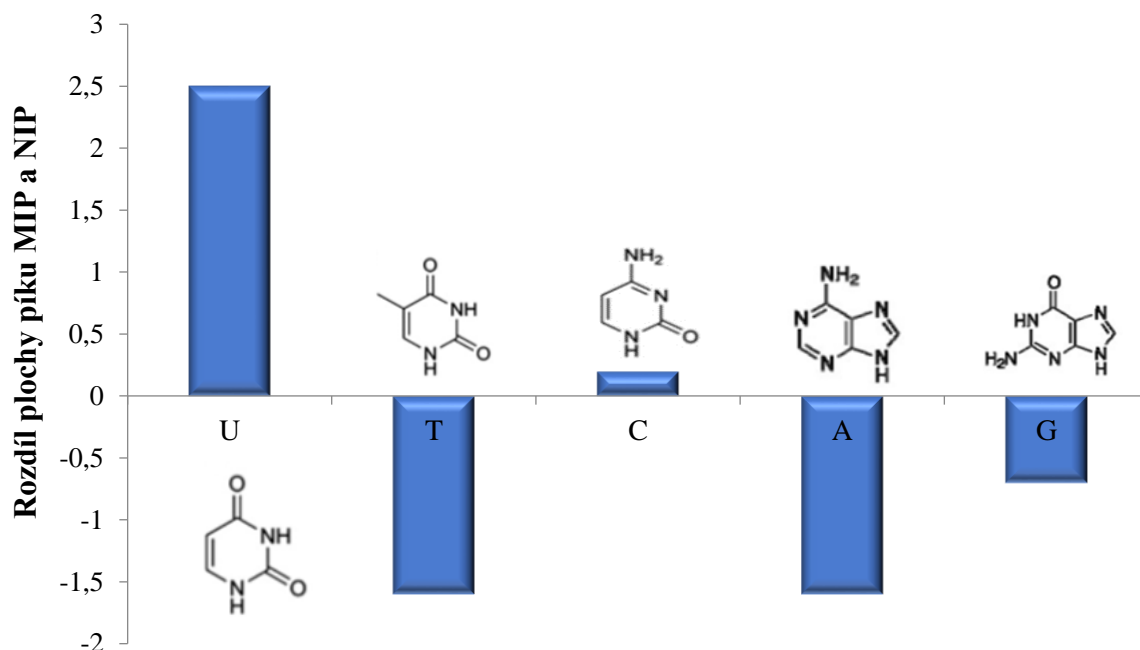


Graf 5: Kalibrační řada uracilu navázaného na MIPs a NIPs

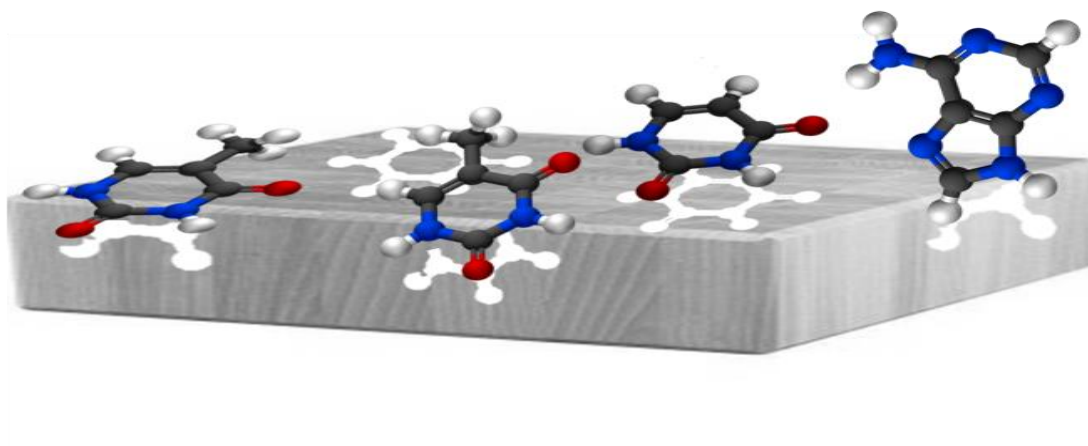
### 5.5 Ověření vazebné selektivity

U MIPs připravených za optimálních podmínek byla ověřována jejich schopnost rozlišovat mezi nukleovými bázemi. Jako kompetitor k uracilu byly použity tyto molekuly: cytosin, tymin, adenin, guanin a purin. Výsledky jsou zaznamenány v grafu 6. Negativní hodnoty selektivity se objevily v situaci, kdy množství nukleové báze vázané NIPs bylo vyšší než množství nukleových bází vázaných MIPs. Z naměřených dat je vidět, že vytvořený polymer má schopnost selektivně izolovat uracil ze vzorku. Jiné nukleové báze tvořily neselektivní vazbu nebo velmi malé množství z nich bylo navázáno selektivně (jako je tomu v případě cytosinu). Neselektivní chování MIPs může být způsobeno tvorbou kavit. Na obrázku 15 je výřez MIP vrstvy, kde jsou znázorněny možnosti tvorby vazebných míst:

1. Molekuly mohou být otištěny v horizontální poloze. Tyto kavity mají nejlepší selektivitu a jiné, než potištěné molekuly s nimi interagují pouze minimálně.
2. Molekuly mohou být otištěny ve svislé poloze. Tyto dutiny nejsou tak selektivní, protože je otištěna pouze část molekuly. V tomto případě mohou být v těchto dutinách navázány další molekuly, které mají podobnou část jako otiskovaný templát.
3. Molekuly mohou interagovat neselektivně. Což znamená, že molekuly jsou navázány mimo kavity. Tato interakce může být způsobena volnými funkčními skupinami polymerních molekul na povrchu.



Graf 6: Ověření vazebné selektivity s ostatními dusíkatými bázemi



Obrázek 15: Model imprintované polymerní vrstvy

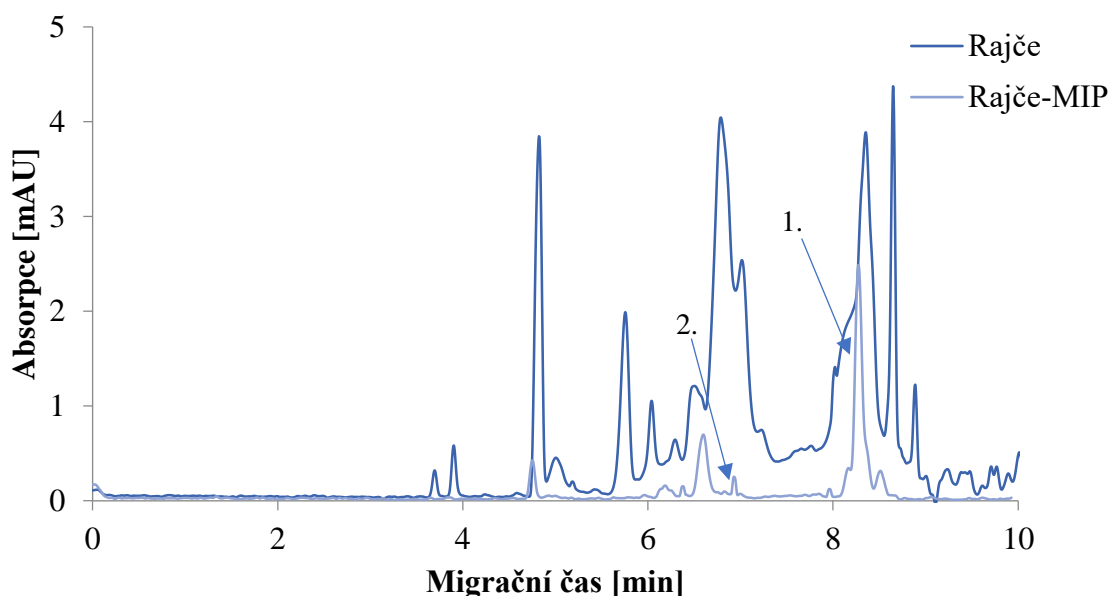
## 5.6 Indikace bakteriální kontaminace v potravinách

Mikrobiologická kontaminace potravin je jedním z nejzávažnějších problémů současného světa. Pro zajištění kvalitních a bezpečných potravin jsou stanovena mikrobiologická kritéria, která nařizují výrobcům kontrolovat celý výrobní proces od používaných surovin až po hotové produkty [64]. V současné době se stanovují kontaminované potraviny na základě přítomnosti mikrobiálních metabolitů kyseliny máselné a octové [41]. Tyto metabolity však nejsou termostabilní a mohou tak podávat zkreslené výsledky. V současné době tedy roste zájem o objevení nových a přesnějších indikátorů bakteriální kontaminace. Mezi jednu z možností, jak indikovat bakteriální kontaminaci patří stanovení obsahu uracilu. Mikrobiálně nezávadné potraviny přirozeně uracil neobsahují, ten vzniká až vlivem působení mikroorganismů, kteří metabolizují přirozeně se v potravinách vyskytující uridin na uracil a ribózu. V této části

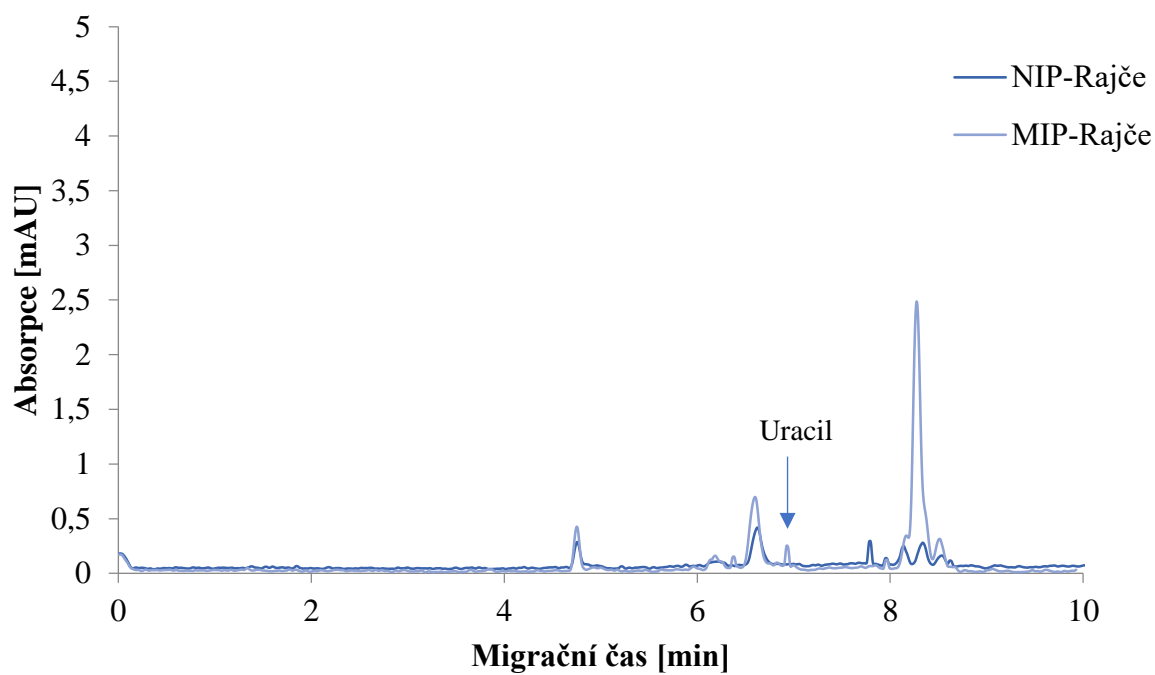
bakalářské práce byla tedy věnována pozornost stanovení uracilu v potravinách, konkrétně v rajčatech a jejich produktech.

### 5.6.1 Rajče soudkové

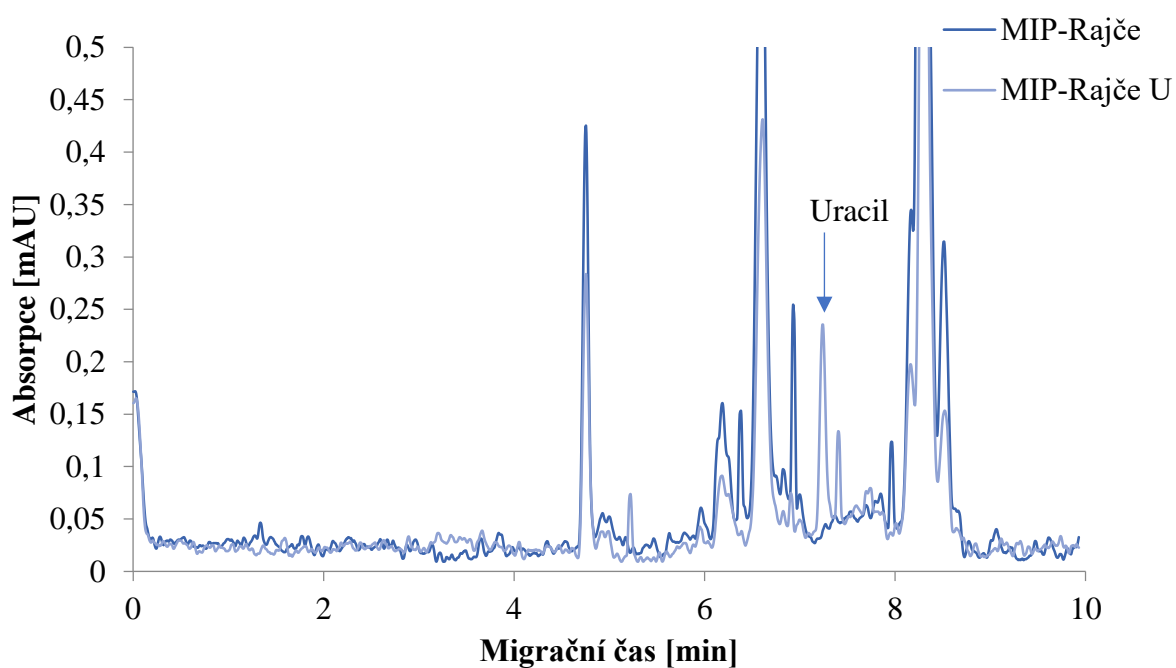
Rajče soudkové bylo vybráno jako první studovaný vzorek. Rajče bylo homogenizováno a analyzováno pomocí CE-UV. Poté byla homogenizovaná směs aplikována na MIPs. Rozdíl elektroferogramů obou těchto měření je zaznamenán v grafu 7. Z elektroferogramu samotného rajčete je obtížné zjistit, zda rajče obsahovalo uracil, kvůli složitosti matrice. Po aplikaci rajčete na MIPs dojde ke zjednodušení elektroferogramu, ve kterém jsou patrné pouze dva píky s vyšší intenzitou, z nichž jeden je signál purinu (1.), kterého bývá v rajčatech poměrně velké množství (4 mg/100 g, druhý signál byl na základě spektrální identifikace identifikován jako uridin (2.)). Uracil v rajčeti nebyl detekován. Pro ověření funkčnosti MIPs v komplexních matricích byl proveden experiment, ve kterém bylo na MIPs aplikováno homogenizované rajče s umělým přídavkem uracilu. Elektroferogram tohoto měření je zaznamenán v grafu 8. Z naměřených dat je patrné, že MIPs jsou schopny izolovat uracil i z komplexní matrice, je-li v ní přítomen. Pro ověření nespecifických interakcí bylo homogenizované rajče s přídavkem uracilu přidáno i k NIPs. V grafu 9 je porovnání elektroferogramu MIPs a NIPs, ze kterého vyplývá, že se uracil váže specificky a nedochází k nespecifickým interakcím. Ze získaných výsledků také vyplývá, že studovaná potravina nebyla pravděpodobně kontaminována mikroorganismy.



Graf 7: Elektroferogramy homogenizovaného rajčete a homogenizovaného rajčete po aplikaci na MIPs



Graf 8: Ověření nespecifických interakcí uracilu. Elektroferogramy homogenizovaného rajčete po aplikaci na MIPs a NIPs

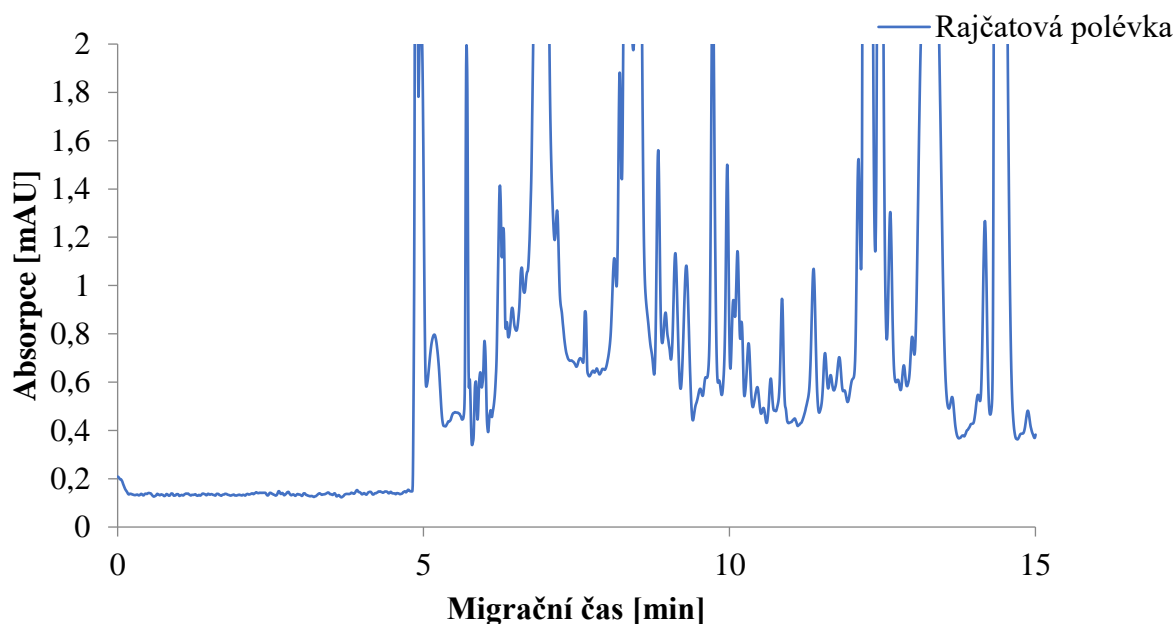


Graf 9: Ověření funkčnosti MIPs v komplexních vzorcích. Elektroferogramy homogenizovaného rajčete s a bez přídavku uracilu po aplikaci na MIPs

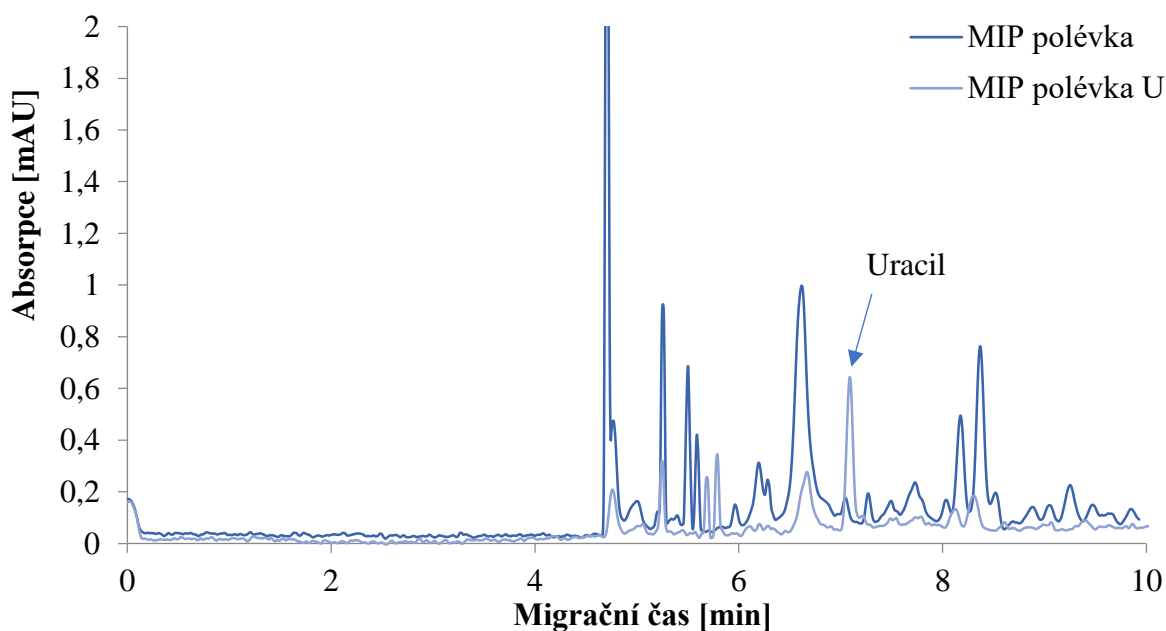


### 5.6.2 Rajčatová Polévka

Jako další vzorek byla použita instantní rajčatová polévka. Elektroferogram samotné rajčatové polévky, který má demonstrovat složitost matrice je zaznamenán v grafu 10. Pro ověření přítomnosti uracilu byla na MIPs aplikována rajčatová polévka bez i s přidavkem uracilu. V grafu 11 jsou zaznamenány elektroferogramy obou výše zmíněných měření. Z dat je patrné, že uracil ve vzorku polévky byl přítomen v malém množství. To mohl být vyroben z mikrobiálně kontaminovaných surovin, případně mohlo dojít k jeho kontaminaci v průběhu výroby či skladování.



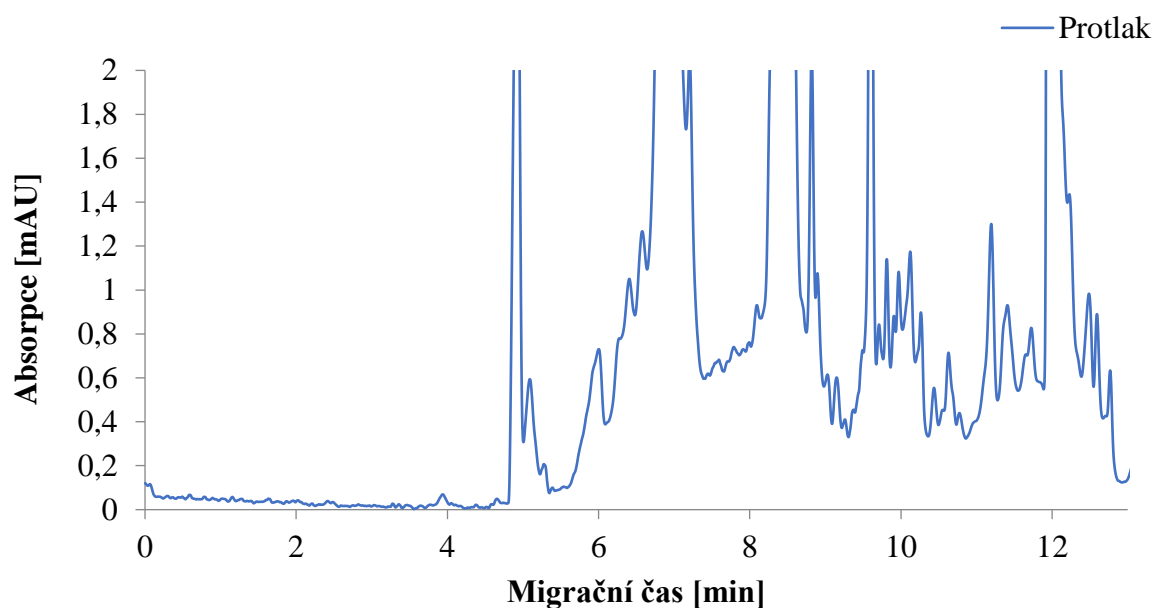
Graf 10: Elektroferogram rajčatové polévky



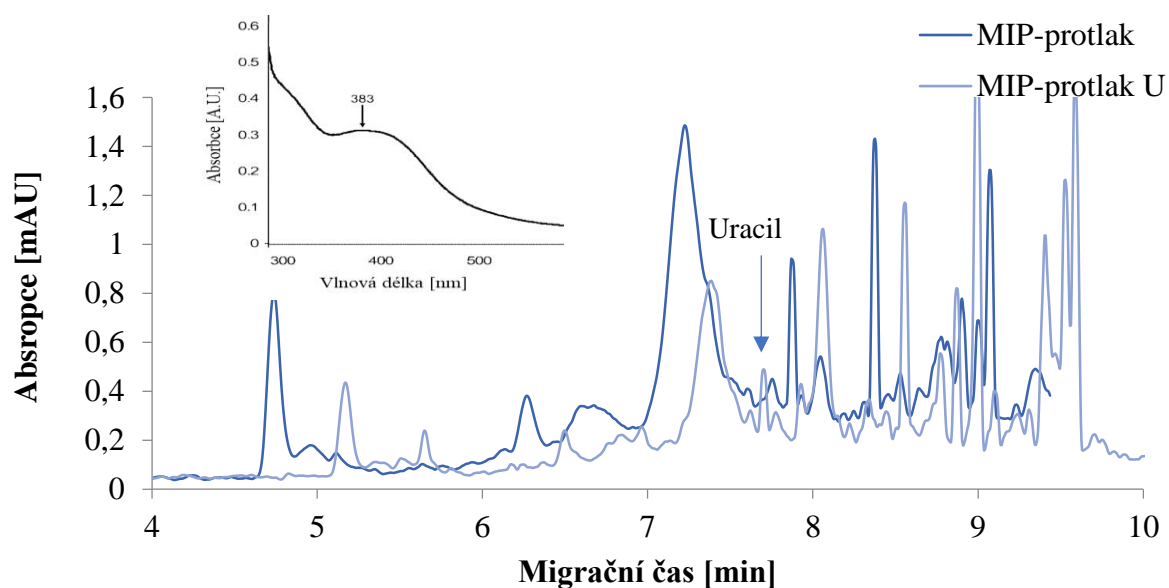
Graf 11: Elektroferogramy rajské polévky s i bez přidavku uracilu po aplikaci na MIPs

### 5.6.3 Rajčatový protlak

Posledním zkoumaným vzorkem byl rajský protlak. Komplexnost matrice rajského protlaku je demonstrována v grafu 12. Po aplikaci vzorku na MIPs došlo ke zjednodušení elektroferogramu, bohužel však docházelo i k neselektivním vazbám na povrch MIPs. Nicméně na základě specifického spektra uracilu (Graf 13), byla prokázána přítomnost uracilu ve vzorku. Opět byl proměřen i vzorek s umělým přídavkem uracilu. Elektroferogramy obou měření jsou zaznamenána v grafu 13. Z naměřených dat lze usuzovat, že protlak mohl být bakteriálně kontaminován. Buď mohl být vyroben z mikrobiálně kontaminovaných surovin, případně mohlo dojít k jeho kontaminaci v průběhu výroby či skladování.



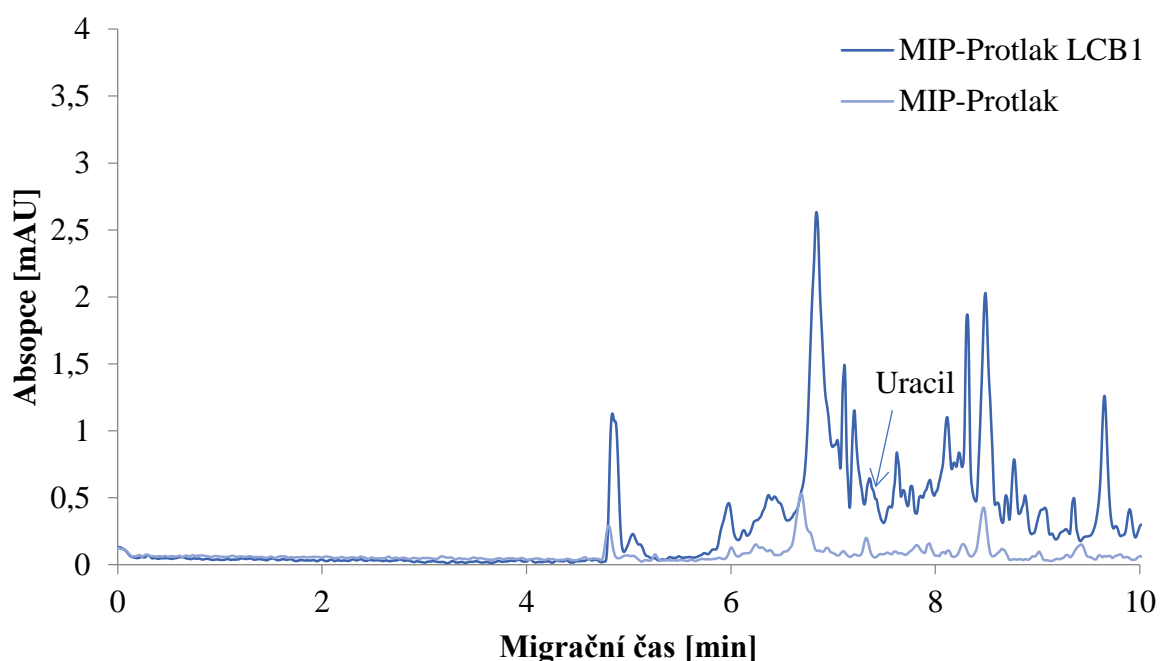
Graf 12: Elektroferogram roztoku rajčatového protlaku



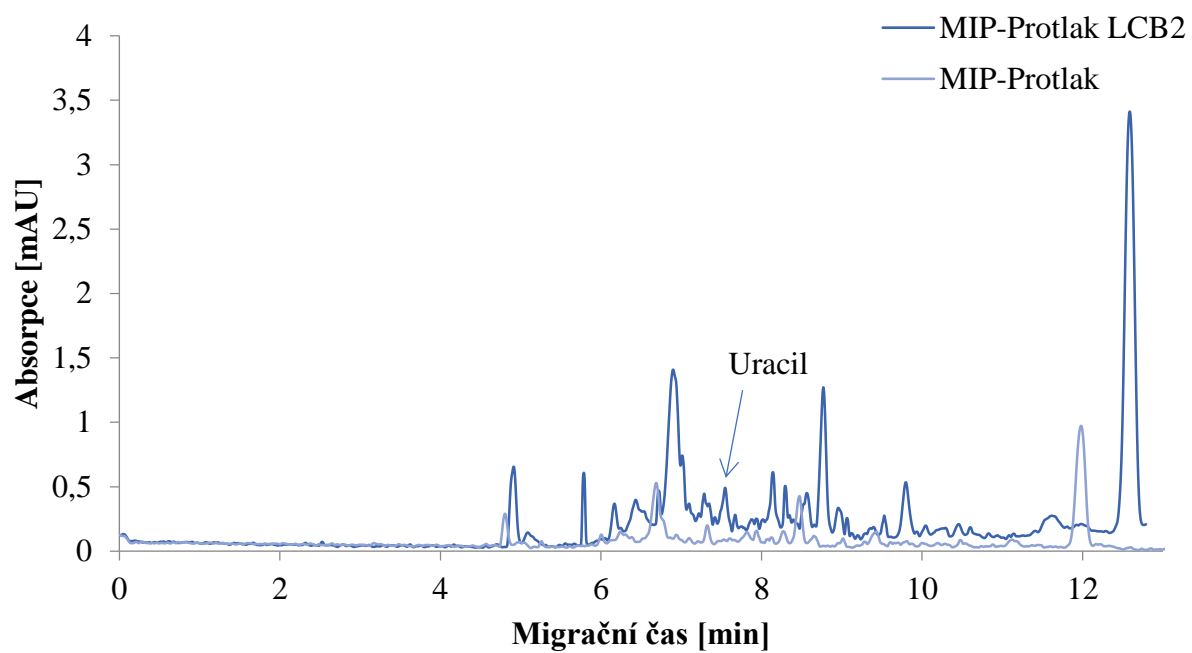
Graf 13: Elektroforegramy rajského protlaku s i bez přídavku uracilu po aplikaci na MIPs; absorpční spektrum uracilu. V levém rohu obrázku je spektrum specifické pro nukleovou bázi uracilu.

#### 5.6.4 Rajčatový protlak po inokulaci bakterií

Pro ověření mikrobiální přeměny přirozeně se v potravinách vyskytující uridinu na uracil a ribózu byl navržen následující experiment. Vzorek rajského protlaku byl inokulován bakteriemi a inkubován po 24 hodin. Jako vhodné mikroorganismy byly zvoleny bakterie rodu *Lactobacillus*, které jsou přirozenými kontaminanty těchto potravin. Konkrétně se jednalo o bakterii *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulganicus* (LCB1) a *Lactobacillus acidophilus* (LCB2). Po 24 hod kultivace byly vzorky rajského protlaku zředěny a aplikovány na MIPs. Naměřená data jsou zaznamenána v grafu 14 pro LCB1 a v grafu 15 pro LCB2. Oba elektroforegramy jsou porovnány s elektroferogramem rajského protlaku aplikovaného na MIPs před přidavkem mikroorganismů. Ve srovnání se vzorky kontaminovanými bakterií je patrné, že došlo k nárůstu koncentrace uracilu. Z porovnání elektroferogramů pro rajský protlak kontaminovaný bakterií LCB1 a LCB2 lze určit díky integraci píku uracilu, že LCB2 vykazuje vyšší schopnost metabolizovat uridin na uracil.



Graf 14: Elektroforegram rajského protlaku kontaminovaného bakterií LCB1 po aplikaci na MIPs



Graf 15: Elektroforegram rajského protlaku kontaminovaného bakterií LCB2 po aplikaci na MIPs

## 6 ZÁVĚR

V předložené bakalářské práci byla zkoumána možnost využití uracilu jako indikátoru bakteriální kontaminace potravin. Ve vyvinutém přístupu byl uracil izolován ze vzorků potravin metodou nekovalentního molekulového imprintingu a následně byl detekován pomocí kapilární elektroforézy s UV-Vis absorpční detekcí ( $\lambda$ –260 nm).

Experimentální část práce byla zaměřena na přípravu a optimalizaci molekulově imprintovaných polymerů selektivních pro detekci uracilu. Pozornost byla zaměřena zejména na promývací krok a na volbu vhodné koncentrace funkčního monomeru, jelikož tyto dva faktory jsou klíčové pro selektivitu výsledných polymerních materiálů. U optimalizovaných imprintovaných polymerů byly studovány vazebné vlastnosti, vazebná kinetika a selektivita. Z naměřených dat bylo zjištěno, že vytvořené imprintované polymery vykazují za optimálních podmínek rychlou adsorpční kinetiku, dostatečnou adsorpční kapacitu a jsou selektivní pro imprintovanou molekulu (uracil).

V další části práce byly imprintované polymery využity pro izolaci uracilu z reálných vzorků: soudkového rajčete, instantní rajčatové polévky a rajského protlaku. Na základě získaných dat bylo prokázáno, že imprintované polymery jsou schopny izolovat uracil i ze složité matrice, kterou použité potraviny představují.

Pro ověření schopnosti bakterií metabolizovat přirozeně se v potravinách vyskytující uridin na uracil a ribózu byl proveden experiment, ve kterém byl vzorek rajského protlaku inokulován bakterií rodu *Lactobacillus* (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulganicus*, *Lactobacillus acidophilus*), která je přirozeným kontaminantem těchto potravin a inkubován 24 hodin za podmínek optimálních pro růst zvolené bakterie. Z výsledků měření vyplývá, že působením bakterie došlo k nárůstu koncentrace uracilu v potravinech a že uracil tedy může být využit jako indikátor bakteriální kontaminace potravin.

Vyvinutá metoda stanovení uracilu v potravinách je velmi jednoduchá, ekologická, rychlá a selektivní. Ve srovnání s metodami, které jsou v současné době používány pro detekci uracilu (HPLC) se jako velká výhoda jeví odstranění komplikovaného a časově náročného procesu předpřípravy/derivatizace vzorku, a především snížení objemu jak vzorku, tak ostatních chemikálií.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Molekulově imprintovaný polymer	MIP
Molekulově neimprintovaný polymer	NIP
Dopamin	DA
Purin	Pu
Adenin	A
Guanin	G
Pyrimidin	Py
Uracil	U
Thymin	T
Cytosin	C
Kyselina octová	HAc
Hydroxid sodný	NaOH
Dodecylsírán sodný	SDS
Kapilární elektroforéza	CE
Elektroosmotický tok	EOF
Křemenná krystalová mikrobilance	QCM
Elektrochromatografie	CEC
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	HPLC
Polydopamin	PDA
Akrylamid	AA
Kyselina methakrylová	MAA
Kyselina 2- (trifluormethyl) akrylová	TFMA
Funkční monomer	FM
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulganicus</i>	LCB1
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LCB2

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. Feng, Y.G., et al., *Ordered macroporous quercetin molecularly imprinted polymers: Preparation, characterization, and separation performance*. Journal of Separation Science, 2017. **40**(4): p. 971-978.
2. Sousa, M.D. and C.M. Barbosa, *Molecularly imprinted polymers for controlling drug release. part 1: synthesis and characterization*. Quimica Nova, 2009. **32**(6): p. 1609-1619.
3. Dickey, F.H., *The preparation of specific adsorbents*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1949. **35**(5): p. 227-229.
4. Wulff, G. and A. Sarhan, *Use of polymers with enzyme-analogous structures for resolution of racemates*. Angewandte Chemie-International Edition, 1972. **11**(4): p. 341-&.
5. Arshady, R. and K. Mosbach, *Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization*. Macromolecular Chemistry and Physics-Makromolekulare Chemie, 1981. **182**(2): p. 687-692.
6. Whitcombe, M.J., et al., *A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting - synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol*. Journal of the American Chemical Society, 1995. **117**(27): p. 7105-7111.
7. Mattiasson, B. and L. Ye, *Molecularly Imprinted Polymers in Biotechnology Preface*, in *Molecularly Imprinted Polymers in Biotechnology*, B. Mattiasson and L. Ye, Editors. 2015, Springer Int Publishing Ag: Cham. p. V-VI.
8. Lanza, F., et al., *Development of a semiautomated procedure for the synthesis and evaluation of molecularly imprinted polymers applied to the search for functional monomers for phenytoin and nifedipine*. Analytica Chimica Acta, 2001. **435**(1): p. 91-106.
9. Sellergren, B., *Man-Made Mimics of Antibodies and their Application in Analytical Chemistry*. 2000.
10. Ye, L., O. Ramstrom, and K. Mosbach, *Molecularly imprinted polymeric adsorbents for byproduct removal*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(14): p. 2789-2795.
11. Lisichkin, G.V. and Y.A. Krutyakov, *Molecularly imprinted materials: Synthesis, properties, applications*. Uspekhi Khimii, 2006. **75**(10): p. 998-1017.
12. Svec, F. and J.M.J. Frechet, *Molded rigid monolithic porous polymers: An inexpensive, efficient, and versatile alternative to beads for the design of materials for numerous applications*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 1999. **38**(1): p. 34-48.
13. Kumbar, S., Laurencin, C. and Deng, M., *Natural and Synthetic Biomedical Polymer*. Elsevier Science, 2014.
14. Haginaka, J., *Molecularly imprinted polymers as affinity-based separation media for sample preparation*. Journal of Separation Science, 2009. **32**(10): p. 1548-1565.
15. Sanbe, H., K. Hosoya, and J. Haginaka, *Preparation of uniformly sized molecularly imprinted polymers for phenolic compounds and their application to the assay of bisphenol A in river water*. Analytical Sciences, 2003. **19**(5): p. 715-719.
16. Enrique Saldivar-Guerra , E.V.-L., *Handbook of Polymer Synthesis, Characterization, and Processing*. 2013.
17. Robert J. Young, P.A.L., *Introduction to Polymers*. 2011.
18. Matsui, J., O. DoblhoffDier, and T. Takeuchi, *2-(trifluoromethyl)acrylic acid: A novel functional monomer in non-covalent molecular imprinting*. Analytica Chimica Acta, 1997. **343**(1-2): p. 1-4.
19. Takeuchi, T. and T. Hishiya, *Molecular imprinting of proteins emerging as a tool for protein recognition*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2008. **6**(14): p. 2459-2467.

20. Jiang, J.H., et al., *Surface Characteristics of a Self-Polymerized Dopamine Coating Deposited on Hydrophobic Polymer Films*. Langmuir, 2011. **27**(23): p. 14180-14187.
21. Xia, Z.W., et al., *Facile synthesis of polydopamine-coated molecularly imprinted silica nanoparticles for protein recognition and separation*. Biosensors & Bioelectronics, 2013. **47**: p. 120-126.
22. Iqbal, Z., E.P.C. Lai, and T.J. Avis, *Development of polymer-modified magnetic nanoparticles and quantum dots for Escherichia coli binding test*. Microchimica Acta, 2012. **176**(1-2): p. 193-200.
23. Zhao, Y.Y., et al., *Surface imprinted polymers based on amino-hyperbranched magnetic nanoparticles for selective extraction and detection of chlorogenic acid in Honeysuckle tea*. Talanta, 2018. **181**: p. 271-277.
24. Zhou, X.S., et al., *Photoreduction preparation of Cu<sub>2</sub>O@polydopamine nanospheres with enhanced photocatalytic activity under visible light irradiation*. Journal of Solid State Chemistry, 2017. **254**: p. 55-61.
25. Chen, L.X., S.F. Xu, and J.H. Li, *Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications*. Chemical Society Reviews, 2011. **40**(5): p. 2922-2942.
26. Sreenivasan, K., *Synthesis and evaluation of molecularly imprinted polymers for nucleic acid bases using aniline as a monomer*. Reactive & Functional Polymers, 2007. **67**(10): p. 859-864.
27. Rachkov, A. and N. Minoura, *Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach*. Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology, 2001. **1544**(1-2): p. 255-266.
28. Flam, F., *Molecular imprints make a mark*. Science, 1994. **263**(5151): p. 1221-1222.
29. Hjerten, S., et al., *Gels mimicking antibodies in their selective recognition of proteins*. Chromatographia, 1997. **44**(5-6): p. 227-234.
30. Spivak, D.A. and K.J. Shea, *Binding of nucleotide bases by imprinted polymers*. Macromolecules, 1998. **31**(7): p. 2160-2165.
31. Dueholm, K.L., et al., *Synthesis of peptide nucleic-acid monomers containing the 4 natural nucleobases - thymine, cytosine, adenine, and guanine and their oligomerization*. Journal of Organic Chemistry, 1994. **59**(19): p. 5767-5773.
32. Ishikawa T, A.W., Kaneko K., *Metabolic Interactions of Purine Derivatives with Human ABC Transporter ABCG2: Genetic Testing to Assess Gout Risk*. 2013.
33. Nuevo, M., et al., *Formation of Uracil from the Ultraviolet Photo-Irradiation of Pyrimidine in Pure H<sub>2</sub>O Ices*. Astrobiology, 2009. **9**(7): p. 683-695.
34. Somerville, *Uracil*. Encyclopedia of Genetics, 2001: p. 2100-2101.
35. Ahene, A.B., S. Saxena, and S. Nacht, *Photoprotection of solubilized and microdispersed melanin particles*. Journal of Investigative Dermatology, 1994. **102**(2): p. 268-268.
36. Chang, C.J., et al., *Effects of the melanogenic inhibitor, uracil, derived from Lactobacillus plantarum TWK10-fermented soy milk on anti-melanogenesis in B16F0 mouse melanoma cells*. Journal of Functional Foods, 2015. **17**: p. 314-327.
37. Yan, N., et al., *HIV DNA is heavily uracilated, which protects it from autointegration*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(22): p. 9244-9249.
38. Walker, E., C. Pritchard, and S. Forsythe, *Food handlers' hygiene knowledge in small food businesses*. Food Control, 2003. **14**(5): p. 339-343.
39. Morris, C.E., *Dual-column chromatography for peak identification in ion moderated partition HPLC*. Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications, 1986. **9**(7): p. 415-416.



40. Hidalgo, A., C. Pompei, and A. Galli, *Uracil evolution in tomato pulp inoculated with different microbial strains during a long incubation time*. Food Chemistry, 2007. **104**(4): p. 1327-1332.
41. Hicks, K.B., et al., *Analysis of uridine and uracil in caprine milk by high-performance liquid-chromatography*. Journal of Dairy Science, 1985. **68**(2): p. 300-306.
42. Hidalgo, A., et al., *Uracil as an index of lactic acid bacteria contamination of tomato products*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(2): p. 349-355.
43. A. R. Srinivasan, R.R.S., Marcia O. Fenley, Alexander H. Boschitsch, Atsushi Matsumoto, Andrew V. Colasanti, and Wilma K. Olson, *Properties of the nucleic-acid bases in free and Watson-Crick hydrogen-bonded states: computational insights into the sequence-dependent features of double-helical DNA*. 2009: p. 13-20.
44. Huang, X.H., et al., *A Practical Model of Quartz Crystal Microbalance in Actual Applications*. Sensors, 2017. **17**(8): p. 9.
45. Lane, T.J., et al., *Quartz resonator-based approach to ultrasonic rheology of a mixed-phase micellar system*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(20): p. 7840-7845.
46. Fuchiwaki, Y., et al., *Inkjet monitoring technique with quartz crystal microbalance (QCM) sensor for highly reproducible antibody immobilization*. Sensors and Actuators a-Physical, 2014. **219**: p. 1-5.
47. Maglio, O., et al., *A Quartz Crystal Microbalance Immunosensor for Stem Cell Selection and Extraction*. Sensors, 2017. **17**(12): p. 14.
48. Marx, K.A., *Quartz crystal microbalance: A useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution-surface interface*. Biomacromolecules, 2003. **4**(5): p. 1099-1120.
49. Ratautaite, V., et al., *Characterization of caffeine-imprinted polypyrrole by a quartz crystal microbalance and electrochemical impedance spectroscopy*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2015. **212**: p. 63-71.
50. Bullock, J., *Application of capillary electrophoresis to the analysis of the oligomeric distribution of polydisperse polymers*. Journal of Chromatography, 1993. **645**(1): p. 169-177.
51. Peters, E.C., et al., *Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography*. Analytical Chemistry, 1997. **69**(17): p. 3646-3649.
52. Blessum, C., et al., *Capillary electrophoresis: principles and practice in clinical laboratory*. Annales De Biologie Clinique, 1999. **57**(6): p. 643-657.
53. Jorgenson, J.W. and K.D. Lukacs, *Zone electrophoresis in open-tubular glass-capillaries*. Analytical Chemistry, 1981. **53**(8): p. 1298-1302.
54. Jorgenson, J.W. and K.D. Lukacs, *Free-zone electrophoresis in glass-capillaries*. Clinical Chemistry, 1981. **27**(9): p. 1551-1553.
55. Tatar, F., et al., *Plug dispersion compensation in moving field capillary electrophoresis applications*. Transducers '07 & Eurosensors Xxi, Digest of Technical Papers, Vols 1 and 2. 2007, New York: Ieee.
56. Mangelings, D. and Y. Vander Heyden, *Enantioselective capillary electrochromatography: Recent developments and new trends*. Electrophoresis, 2011. **32**(19): p. 2583-2601.
57. Melanson, J.E., N.E. Barylka, and C.A. Lucy, *Dynamic capillary coatings for electroosmotic flow control in capillary electrophoresis*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2001. **20**(6-7): p. 365-374.
58. Ding, W.L., M.J. Thornton, and J.S. Fritz, *Capillary electrophoresis of anions at high salt concentrations*. Electrophoresis, 1998. **19**(12): p. 2133-2139.

59. Schwer, C. and E. Kenndler, *Electrophoresis in fused-silica capillaries - the influence of organic-solvents on the electroosmotic velocity and the zeta-potential*. Analytical Chemistry, 1991. **63**(17): p. 1801-1807.
60. Salomon, K., D.S. Burgi, and J.C. Helmer, *Evaluation of fundamental properties of a silica capillary used for capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography, 1991. **559**(1-2): p. 69-80.
61. Wang, C.C., J.K. Prasain, and S. Barnes, *Review of the methods used in the determination of phytoestrogens*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2002. **777**(1-2): p. 3-28.
62. Batlokwa, B.S., et al., *Optimal Template Removal from Molecularly Imprinted Polymers by Pressurized Hot Water Extraction*. Chromatographia, 2011. **73**(5-6): p. 589-593.
63. Ansell, R.J., *Characterization of the Binding Properties of Molecularly Imprinted Polymers*, in *Molecularly Imprinted Polymers in Biotechnology*, B. Mattiasson and L. Ye, Editors. 2015. p. 51-93.
64. Ochubiojo, B.I.N.E.a.E.M., *Food Quality Control: History, Present and Future*. 2012: p. 20.